



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efectos de monoterpenos, capsaicina y piperina sobre
receptores TRP en la musculatura lisa de tráquea de cobayo**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FERNANDO JOSÉ LUNA CASTELLANOS

JURADO

PRESIDENTE:	Profesor: Andrés Navarrete Castro
VOCAL:	Profesor: José Fausto Rivero Cruz
SECRETARIO:	Profesor: María Eva González Trujano
1er. SUPLENTE:	Profesor: Ruth Ivonne Téllez Ballesteros
2° SUPLENTE:	Profesor: Alberto Hernández León

LABORATORIO 126, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, CDMX, septiembre 2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE TEMÁTICO

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1 Fisiopatología de enfermedades respiratorias.....	9
3.2 Tos.....	11
3.3 Receptores de Potencial Transitorio en vías aéreas.....	12
3.4 TRPV1 y TRPM8 en patologías de las vías aéreas.....	13
3.5 Capsaicina, piperina y monoterpenos.....	15
3.6 Agonismo y antagonismo, efecto aditivo y sinergia.....	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS.....	25
6.1 Objetivo general.....	25
6.2 Objetivos específicos.....	25
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 Reactivos.....	26
7.2 Material biológico.....	26
7.3 Procedimiento experimental.....	26
7.3.1 Disección de la tráquea y estabilización del tejido.....	26
7.3.2 Evaluación de la contracción con capsaicina.....	27
7.3.3 Evaluación de la contracción con piperina.....	27
7.3.4 Evaluación del efecto inhibitorio de la contracción con capsaicina debido a la presencia de monoterpenos mentol, timol y linalool.....	28
7.3.5 Evaluación de relajación con mentol.....	28
7.3.6 Evaluación de la interacción de capsaicina y piperina en su efecto de contracción.....	28
7.4 Cálculo de parámetros y análisis estadístico.....	30
8. RESULTADOS.....	31
9. DISCUSIÓN.....	42
10. CONCLUSIÓN.....	46
11. PERSPECTIVAS.....	47
12. REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de contracción y relajación de músculo liso
- Figura 2.** Estructura de capsaicina
- Figura 3.** Estructura de piperina
- Figura 4.** Estructura de mentol
- Figura 5.** Estructura de timol
- Figura 6.** Estructura de linalool
- Figura 7.** Curvas de concentración-respuesta de contracción de capsaicina y piperina
- Figura 8.** Efecto de atenuación de la contracción ocasionada por capsaicina con previa incubación a distintas concentraciones del aceite de linalool
- Figura 9.** Efecto de atenuación de la contracción ocasionada por capsaicina con previa incubación a distintas concentraciones de timol
- Figura 10.** Efecto de atenuación de la contracción ocasionada por capsaicina con previa incubación a distintas concentraciones de mentol
- Figura 11.** Registro del polígrafo de un canal donde se observa la relajación.
- Figura 12.** Curva de relajación del mentol, del timol y del linalool
- Figura 13.** Curvas concentración-respuesta de relajación ocasionada por mentol
- Figura 14.** Curvas concentración-respuesta de contracción de capsaicina, piperina y sus combinaciones en (gramos-fuerza).
- Figura 15.** Curvas concentración-respuesta de contracción de capsaicina, piperina y sus combinaciones (en porcentaje).
- Figura 16.** Efecto de la mediana para el efecto contráctil ocasionado por capsaicina y piperina.
- Figura 17.** Índice de combinación en función de la fracción afectada para las combinaciones binarias.
- Figura 18.** Isoblograma normalizado de la concentración efectiva cincuenta para las combinaciones binarias.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones utilizadas para determinar el efecto de combinación de capsaicina y piperina en relación 1:1

Cuadro 2. Concentraciones utilizadas para determinar el efecto de combinación de capsaicina y piperina en relación 3:1

Cuadro 3. Concentraciones utilizadas para determinar el efecto de combinación de capsaicina y piperina en relación 1:3

Cuadro 4. Relación de los parámetros de la curva de concentración-efecto de Capsaicina y Piperina por la ecuación del efecto mediano.

Cuadro 5. Parámetros de Índice de Combinación (IC) y de Índice de reducción de dosis (IRD) de la gráfica de IC en función de la fracción afectada (*fa*).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ACh** – Acetilcolina
- ADP** – Adenosín difosfato
- HVA** – Hiperreacción de las vías aéreas
- ATP** – Adenosin trifosfato
- Ca²⁺** – Cation calcio
- [Ca²⁺]_i** – Concentración intracelular del cation calcio
- Cap** – Capsaicina
- CCh** – Carbacol
- CYP3A4** – Citocromo P450 3A4
- RGD** – Raíces de ganglio dorsal
- EEM** – Error Estándar de la Media
- E_{máx}** – Efecto máximo
- EPOC** – Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- FDA** – Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés)
- RAPG** – Receptores asociados a proteínas G
- IC** – Índice de combinación
- IRD** – Índice de reducción de dosis
- KHS** – Solución Krebs-Henseleit (por sus siglas en inglés)
- MCLP** – Fosfatasa de cadena ligera de miosina
- MLB** – Músculo Liso Bronquial
- MLCK** – Cinasa de cadena ligera de miosina (por sus siglas en inglés)
- PGE₂** – Prostaglandina E₂
- PGF_{2α}** – Prostaglandina F_{2α} o dinoprost
- Pip** – Piperina
- PKC** – Cinasa de proteína C
- TRPA1** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Ankirina miembro 1
- TRPC** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Canónicos
- TRPM8** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Melastatina miembro 8
- TRPML** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Mucolipina
- TRPP** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Policistina
- TRPV1** – Receptor de Potencial Transitorio de la subfamilia Vainillósido miembro 1

1. RESUMEN

La capsaicina es el fitoquímico/metabolito secundario principal de las plantas del género *Capsicum* y es responsable de la pungencia de los chiles. En la dieta de la población del territorio mexicano el chile es protagonista, pues es utilizado en una gran variedad de platillos, además de emplearse también para condimentar los alimentos. Otro condimento que también se usa en muchos platillos en la dieta del mexicano es la pimienta negra, cuyo compuesto característico y pungente es la piperina, la cual se obtiene de la planta de la *Piper nigrum*. Se ha descrito que estos compuestos poseen actividad contráctil en el músculo liso debido a que se unen a los canales iónicos TRPV1. Estos receptores tienen una función importante en las vías respiratorias en condiciones patológicas como Asma y EPOC, puesto que se ha encontrado una mayor expresión de éstos en las vías respiratorias, donde existe una falta de regulación en el ion calcio extracelular, además de tener un rol importante en la transducción de estímulos nocivos. Por otro lado, los TRPM8 también se expresan en las vías aéreas, aunque poco se ha estudiado sobre su papel funcional en las patologías mencionadas. Se sabe que en el músculo liso posee un efecto relajante en presencia de estimulantes exógenos como el mentol, obtenido de plantas del género *Mentha*. El presente trabajo tiene como propósito determinar si la presencia de mentol y otros monoterpenos como el linalool y el timol son capaces de inhibir las contracciones producidas por la capsaicina sobre la musculatura lisa de las vías aéreas; asimismo se pretende determinar si la presencia simultánea de la capsaicina y piperina presentan un efecto de adición y/o de sinergia. Como estrategia experimental se realizaron curvas acumulativas concentración—respuesta de capsaicina y piperina para determinar el porcentaje de efecto sobre la musculatura lisa de las vías aéreas; se encontró que la capsaicina es más potente que la piperina, aunque esta última tiene una pendiente más vertical en la respuesta de contracción. Posteriormente se realizaron incubaciones de 10 minutos con distintas concentraciones de los monoterpenos en la cámara de órgano aislado para posteriormente realizar las curvas de contracción inducidas con capsaicina. Se observó que los monoterpenos producen un efecto de atenuación de la contracción que no está asociado a la dosis de éstos. Con combinaciones de las CE_{50} de la capsaicina y piperina a combinaciones en relaciones 1:1, 3:1 y 1:3 se realizaron curvas de contracción al añadir simultáneamente las soluciones de los compuestos. Se encontró que existe un efecto de sinergia entre ambos.

2. INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas la cual se define con base en genotipos descriptivos, incluyendo obstrucción variable del flujo de aire, hiperrespuesta, y la presencia de síntomas como tos, disnea, sibilancia y tensión en el pecho. Es una enfermedad con prevalencia en aumento a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. ^[1] En particular, la EPOC es una de las causas principales de mortalidad a nivel mundial, y a diferencia del asma, no existen en el mercado tratamientos que puedan prevenir el progreso de la enfermedad. Una característica que comparten ambas enfermedades es la obstrucción de las vías aéreas; el impedimento de flujo de aire en el caso del asma es variable y comúnmente reversible. La hiperreactividad, sin embargo, no es una característica de EPOC, aunque sí se han visto un aumento en la respuesta hacia algunos agonistas. La inflamación crónica es algo que se observa en ambos padecimientos, así como episodios de exacerbación, la cual normalmente es causada por infecciones bacterianas o virulentas, lo cual evidentemente empeora la inflamación ya existente. ^[2]

Es importante destacar que los Receptores de Potencial Transitorio (TRP por sus siglas en inglés) tienen una función importante en enfermedades de las vías aéreas, además de que se sabe que varios activadores de éstos están aumentados, incluyendo a eicosanoides y sus productos de degradación, factores asociados al estrés oxidativo, pH bajo, cambios en la osmolaridad y alteraciones en la temperatura. Sumado a esto, se conoce que en el estado de estos padecimientos los canales TRP presentan un aumento en la sensibilidad a ligandos endógenos y exógenos. ^[2]

Los tratamientos farmacológicos actuales para el asma se pueden dividir en broncodilatadores y antiinflamatorios. Los primeros son el grupo de fármacos más utilizados en clínica, y su acción puede variar entre inhibir la biosíntesis de los mediadores de la contracción del músculo liso, inhibir su liberación, o bien, antagonizando al receptor. En este mismo grupo también existen los antagonistas independientes del tipo de mediador contráctil que producen una relajación por distintas vías celulares. Los antiinflamatorios, como su nombre lo indica, inhiben a los componentes que generan la inflamación. Entre los efectos indeseados están deficiencia en el crecimiento en niños, tolerancia al fármaco, dolores de cabeza, náusea, palpitaciones, entre otros. ^[3] En el caso de la EPOC el tratamiento es un poco más complejo, pues se busca reducir las

exacerbaciones y retardar el progreso de la enfermedad. Los tratamientos incluyen también broncodilatadores de acción lenta y rápida, como agonistas β_2 -adrenérgicos y antagonistas muscarínicos, además de antiinflamatorios en forma de corticosteroides para inhalar. Además de esto, se sugiere que los pacientes de esta enfermedad sigan tratamientos no farmacológicos para aliviar los síntomas. ^[4]

En los recientes años se ha tomado un gran interés por estudiar a los TRP porque, como ya se mencionó, juegan un papel importante en la patofisiología del asma y la EPOC. El interés se ha dado porque cada vez se encuentran nuevos compuestos de origen natural que activan o inhiben a los canales TRP, tales como alcaloides, capsaicinoides, monoterpenos que se encuentran en plantas y frutos utilizados frecuentemente en la gastronomía de nuestro país, así como en la medicina tradicional mexicana para tratar estas afecciones.

Se ha demostrado que tanto la capsaicina y la piperina actúan sobre los receptores TRPV1; los monoterpenos son distintos, pues el mentol actúa sobre TRPM8, y el linalool y timol parecen ser selectivos tanto para TRPM8 y TRPA1. Estos canales están presentes en la tráquea de cobayo, sin embargo, no se ha estudiado si su activación simultánea presente algún tipo de interacción.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Fisiopatología de enfermedades respiratorias

El músculo liso de las vías aéreas ha sido reconocido como el tejido principal asociado a la contracción bronquial en el cuadro asmático o tos, por lo cual se considera como blanco clave para estudiar la relajación por fármacos. El músculo liso bronquial (MLB) se distribuye especialmente en vías conductuales, cuya función en las vías aéreas normales es regular el calibre y el tono broncomotor. ^[5] La contracción del músculo liso puede dividirse en 2 fases: la fase inicial que está asociada al desarrollo de la fuerza activa y la fase sostenida que está asociada al mantenimiento. ^[6] Los niveles de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) producen el acortamiento de MLB; la activación de éste por un agonista induce un rápido incremento en el $[Ca^{2+}]_i$, la cual está asociada a una liberación de depósitos de calcio. Este aumento de calcio activa la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) en el complejo sensible calcio-calmodulina, resultando en la fosforilación regulatoria de la MLC_{20} de en el residuo de serina 19. Esta fosforilación, por la actividad de la ATPasa de miosina, inicia un ciclo de puenteo cruzado entre la miosina y la actina; la unión de ATP, su hidrólisis y la liberación de ADP continúan siempre que la MLC_{20} se encuentre fosforilada; cuando es desfosforilada por la MLC fosfatasa termina el ciclo de puenteo cruzado y el músculo liso se relaja. La señalización desencadenada debido a los receptores asociados a proteínas G (RAPG) modulan varios estímulos de inflamación en MLB. Existe una vía paralela con efecto contrario a la MLCK, y ésta es la fosfatasa de MLC (MCLP), la cual contrarresta la acción de la MLCK al desfosforilar a la MLC_{20} . Las vías activadas por RAPG son conocidas por inhibir a la MLCP; estas vías incluyen a la Rho-cinasa y a la cinasa de proteína C (PKC) (ver Figura 1). ^[5, 6]

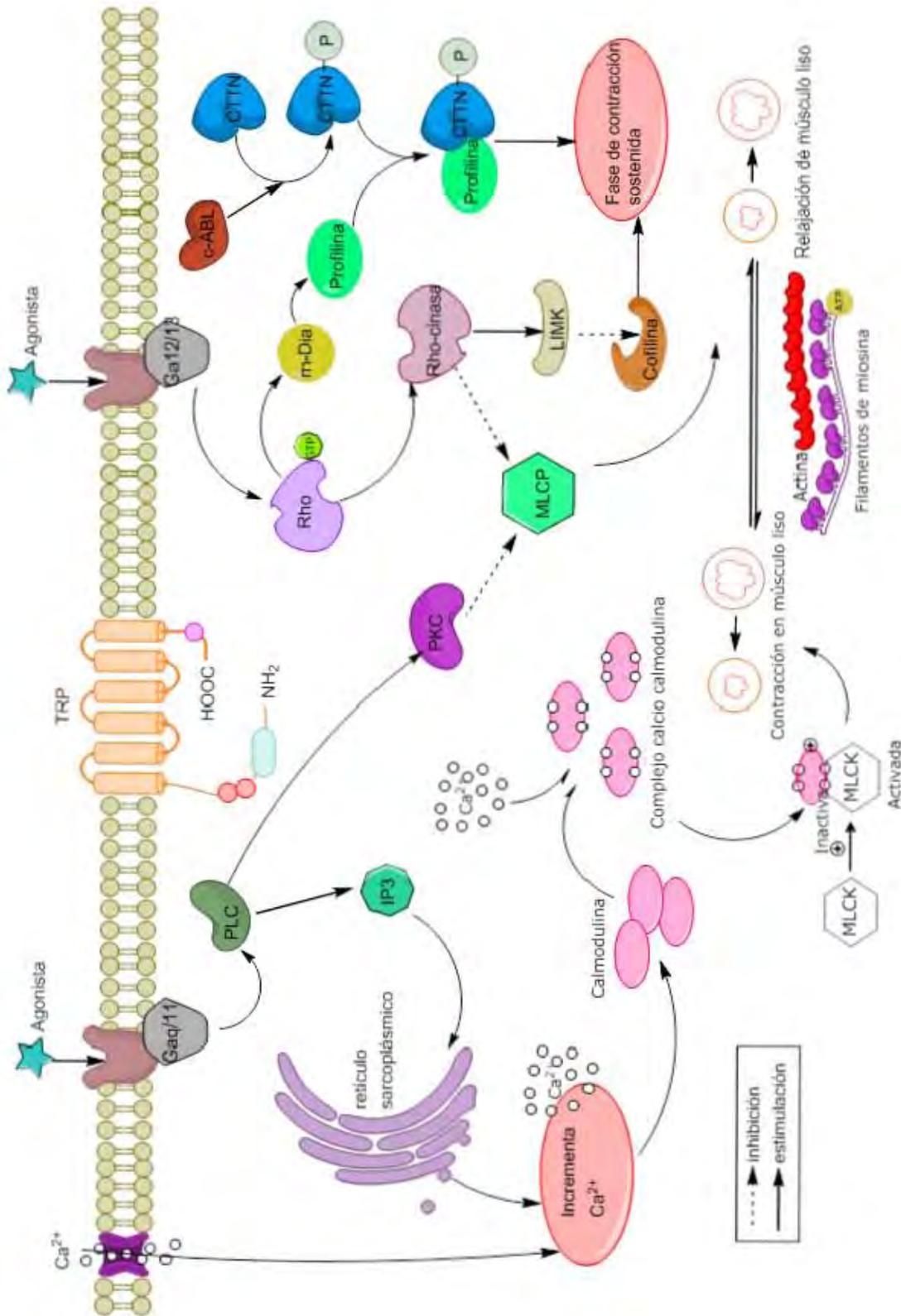


Figura 1. Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso. Diversas sustancias pueden provocar la contracción: noradrenalina en receptores α , agonistas de proteínas G. La relajación puede activarse al inhibir estas respuestas, como la fosforilación de MLCK, lo cual evita la interacción de la miosina con la actina, resultando en la relajación del músculo liso. Adaptado de referencia [5] y [6].

3.2 Tos

La tos es el síntoma respiratorio más común por el cual los pacientes acuden al médico, y la tos crónica es un síntoma importante en alrededor de 30 % de enfermedades respiratorias a nivel clínico. El hecho de que un paciente manifieste tos crónica puede deberse a distintos mecanismos de la patología. Un ejemplo de terapia para la tos que está asociada con asma es el tratamiento con corticosteroides, tratamiento que suele ser el adecuado, pero para la tos producida por reflujo gastroesofágico el tratamiento que responde comúnmente es el uso de inhibidores de la bomba de protones. Para el caso de la tos asociada a EPOC es más difícil tratar la tos pues el tratamiento no incluye efectos antiinflamatorios. Mientras que menos comunes, donde no se puede identificar el origen de la tos, como en la tos idiopática crónica, no existen tratamientos eficientes. Para poder tener un mejor entendimiento acerca de la tos y así poder dilucidar qué tratamiento es el más adecuado, es importante conocer cómo se genera ésta. En estudios experimentales en varios modelos animales se ha concluido que tanto las fibras C no mielinizadas y receptores de adaptación rápida, lo cuales tienen fibras A δ mielinizadas, están involucradas en la tos. ^[7]

Las fibras C de las vías aéreas se activan por un número amplio de irritantes químicos, entre ellos están compuestos contenidos en la comida; otros irritantes ambientales incluyen al humo del cigarro y emanaciones de vehículos. Dada su presencia en las vías aéreas superiores (bronquiales), se cree que el reflejo de la tos inicia ahí, sin embargo, estudios estriban la propuesta de que las fibras C pulmonares inhiben la tos. ^[9] Por otro lado, hay estudios que apuntan que las fibras A δ mielinizadas con terminaciones en la mucosa traqueal pueden inducir a la expresión transitoria de neurocininas y TRPV1, permitiendo así generar una respuesta a sustancias químicas como la capsaicina; estos estudios resaltan la importancia que tienen estos receptores para elegir como blanco la hipersensibilidad asociada a patologías respiratorias. Los receptores de adaptación rápida y los receptores de adaptación lenta son fibras aferentes mecanoreceptoras, las cuales tiene como función pasar de estímulo químico a mecánico, y que tienen terminaciones en las vías intrapulmonares, por lo que pese a que no sean un regulador directo de la tos, algunos estudios afirman que no se pueden descartar en el reflejo de la tos, ya que podrían estar involucrados indirectamente. ^[7]

También estudios recientes sugieren que las fibras vagales aferentes (no clasificadas como C o A δ mielinizadas) pueden estar involucradas. [8] Sin embargo, existe poca información acerca de cuáles fibras aferentes están involucradas en seres humanos; esto es, no se ha reportado el registro de que una fibra en específico ocasione una respuesta que desencadene en tos, pero sí se ha descrito que estímulos que la ocasionan conducen a una despolarización del nervio vago. La estrategia de los tratamientos para la tos es reducir la respuesta que reciben las neuronas aferentes en lugar de inhibir su respuesta completamente, pues esto último podría suprimir el mecanismo de defensa natural de las vías aéreas. Varios mediadores inflamatorios, como bradicinina, ATP, PGE₂ o PGF_{2 α} , activan las neuronas sensoriales de las vías aéreas e inducen sensibilización a otros estímulos que generan tos. [7]

3.3 Receptores de Potencial Transitorio en vías aéreas

Los receptores de potencial transitorio son una superfamilia compuesta hasta la fecha por 28 canales catiónicos (en mamíferos) que se subdividen, a su vez, en 6 subfamilias basado en la homología de su estructura. Se expresan en prácticamente cualquier tipo de célula de todos los tejidos; actúan como sensores al proveer la ruta para el transporte celular; la mayoría de ellos proveen vías de entrada para Ca²⁺, las cuales contribuyen a una plétora de funciones dependientes de calcio, desde la transcripción hasta la muerte celular, pero de especial interés en este trabajo, la contracción del MLB. Topológicamente, cada subunidad del los TRP consiste putativamente en 6 segmentos transmembranales (S1 – 6), un giro formador de poro entre S5 y S6, y –NH₂ y –COOH terminales intracelulares. [9]

La subfamilia de los TRPC (canónicos) consiste en 7 (TRPC1-7); la de los TRPM (melastatina) consisten en 8 canales diferentes (TRPM1-8); La subfamilia de los TRPV (vainilloides) se compone de 6 miembros (TRPV1-6); la más nueva de las subfamilias es la TRPA (ankirina), la cual sólo presenta un miembro en mamíferos (TRPA1). Los TRPP (policistina) y los TRPML (mucolipina) poseen 3 miembros cada una y están pobremente caracterizados hasta el momento. [9]

No existe un mecanismo unificado que englobe la acción de todos los TRPs, aunque sí se puede decir que éstos pueden activarse por un serie de estímulos físicos, como temperaturas, osmolaridad, fuerza mecánica, diferencia de potencial o por la unión a un ligando. Varios canales se activan por cambios de temperatura; los TRPV1 se activan a temperaturas mayores de 42° C, mientras que los TRPM8 se activan a temperaturas desde 10° C a 28 °C. [8]

3.4 TRPV1 y TRPM8 en patologías de las vías aéreas

Los TRPV1 reciben su nombre porque son activados por ligandos vainilloides clásicos como la capsaicina. Primeramente este receptor se identificó como un canal iónico neuronal capaz de detectar estímulos nocivos como calor y dolor; estudios más recientes han demostrado que este es un canal polimodal activado por diversos estímulos como sustancias irritantes, pH ácido, temperaturas superiores a los 42° C y mediadores endógenos. Algunos agonistas endógenos como la anandamida, y exógenos como la capsaicina, son capaces de activar y sensibilizar los TRPV1; gracias a esto, a veces no es posible discernir si el estímulo actúa como «abridor» directo del canal o como sensibilizador, lo cual disminuye el umbral de activación para otro estímulo. También se cree que estos receptores juegan un papel importante en señalizaciones relacionados a RAPG, como por ejemplo, bradicinina y PGE₂. [10]

Las fibras nerviosas positivas a TRPV1 inervan todo el tracto respiratorio, incluyendo la nariz, la laringe, la tráquea, parénquima pulmonar, alveolos, músculo liso y vasos sanguíneos. Estudios reportan que su expresión en estos tejidos es relativamente baja, sin embargo, investigaciones sugieren que su expresión se ve aumentada en pacientes con enfisema, además de estar asociados con tos. De hecho, hay evidencia de que los TRPV1 tienen un rol importante en la desregulación de $[Ca^{2+}]_i$ en pacientes asmáticos. Es por ello que este canal se considera como un «receptor patológico» el cual regula la transducción de estímulos nocivos, el mantenimiento de la inflamación y el reflejo de tos. En efecto, los TRPV1 están asociados a las terminaciones nerviosas de las vías aéreas y sirven como mecanismo de defensa contra agentes endógenos como contaminantes. Los TRPV1 localizados en el epitelio bronquial están idealmente

posicionados para detectar dichos irritantes, por lo que es posible que la respuesta de las vías aéreas a estos estímulos ambientales sean regulados por estos receptores. ^[10]

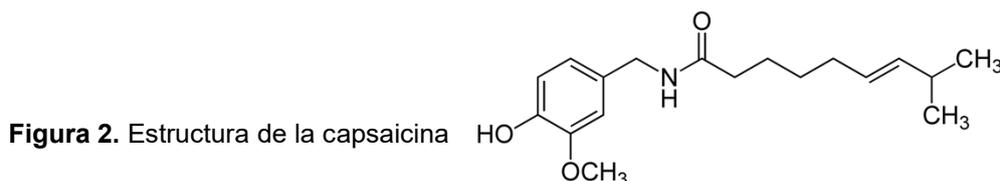
En tejido epitelial de pacientes asmáticos, se ha reportado que existe un aumento de TRPV1 extraneuronal, el cual es un mediador de liberación de interleucina-8 (IL-8), la cual es capaz de mantener una sensibilización neural, lo que es trascendental en el mantenimiento de la sensibilidad a la tos. ^[11] La broncoconstricción es una característica sustancial del asma. Se ha descrito que en el MLB la contracción espasmolítica es regulada por el influjo de Ca^{2+} mediada por canales receptores de este catión. Es muy probable que exista más de un tipo de receptores de Ca^{2+} en el MLB, sin embargo, los canales TRPV1 son altamente selectivos a Ca^{2+} . En asma, la proliferación de células del MLB conlleva a un engrosamiento de las vías aéreas, lo que contribuye a una hiper-reacción. Esta reacción exacerbada está asociada a un aumento en la respuesta de contracción debida a la estimulación de agonistas endógenos. Asimismo, la proliferación de las células del MLB está asociada a su diferenciación a miofibrioblastos y fenotipos secretorios, lo que resulta, además del engrosamiento de las vías aéreas, en liberación de citosinas inflamatorias y factores de crecimiento que «reclutan» leucocitos inflamatorios en el tejido, estimula más proliferación celular, lo que origina a los cambios patológicos observados en el remodelamiento de vías aéreas. Los canales TRPV1 podrían estar involucrados dentro de este proceso de cambios patológicos debido a que su expresión está regulada por factores de crecimiento. ^[12]

La subfamilia de los TRPM no posee repeticiones de ankirina en su dominio N-terminal, son homotetrámeros que permiten las respuestas de cationes. ^[13] Se expresa principalmente en una subpoblación de neuronas sensoriales aferentes que responden a estímulos «fríos», en raíces de ganglio dorsal (RGD) y ganglio trigeminal, y son diferentes a las neuronas que expresan TRPV1. Los TRPM8 son termosensores activados por temperaturas fisiológicas «frías» del rango 10 - 28 °C; entre los activadores directos de estos canales se encuentran el mentol, icilina y eucaliptol. Hasta la fecha no se han reportado ligandos endógenos. La activación de TRPM8 está regulada por fosfoinositoles, siendo esencial el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato para la función y desensibilización del canal. Su expresión en las vías aéreas no es tan significativa en tejido pulmonar y tejido epitelial sano; aunque, el papel que juegan los

TRPM8 en las vías aéreas sanas y otras patologías aún no está muy bien explorado. Algunos autores sostienen la hipótesis de que el efecto relajante o antitusivo mediado por TRPM8 se debe a un reflejo iniciado en la nariz debido a que existe una expresión significativa de estos receptores en las neuronas sensoriales trigeminales nasales. Se ha descrito que el respirar aire frío está implicado en la producción de tos y en la broncoconstricción, pese a que los resultados no han sido concluyentes. Controversialmente, la activación de estos canales inhibe el reflejo de la tos, aunque los datos no fueron rotundos. [14]

3.5 Capsaicina, piperina y monoterpenos

La capsaicina es el compuesto biológicamente activo de los chiles, el cual se obtiene de las plantas del género *Capsicum*, el más consumido. [15] Su nombre químico es trans-8-metil-N-vainillil-6-nonenamida, es un alcaloide de la familia de los vainilloides, por lo que posee un grupo vainilloil (4-hidroxi-3-metoxibencil), que es el farmacóforo; además contiene un anillo de benceno y una cadena de carbono saturada con un grupo amida, lo que lo hace liposoluble.



La capsaicina junto con la dihidrocapsaicina conforman alrededor de 80-90 % de los capsaicinoides encontrados en los chiles, los cuales, además, son los más pungentes. El nivel de pungencia o qué tanto pueden picar los chiles se puede determinar con la escala de Scoville, la cual va desde 0-100 (chile pimienta) hasta 2'000'000-3'000'000 (chile habanero) unidades Scoville; la capsaicina pura sobrepasa los 16 millones de unidades Scoville. [16] Se ha demostrado que gracias a su lipofiliidad, la capsaicina administrada por vía intravenosa se distribuye fácilmente en el cerebro, médula espinal e hígado. [16] Su mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años; se ha demostrado que la capsaicina, al activar las neuronas nociceptivas aferentes, libera sustancia P, además de generar la sensación característica de picor y hasta ardor intenso. [17] La capsaicina es una de las sustancias químicas que activan los receptores TRPV1; el grupo vainilloide es el responsable de esta relación estructura-actividad, puesto que la resiniferatoxina y el olvanilo, que comparten dicho

grupo funcional, también activan este receptor. Además de activar a este receptor, existe una despolarización de la membrana seguido por una rápida y profunda desensibilización; ésta puede resultar en una adaptación a la percepción del dolor por parte de las neuronas responsables. Dicha desensibilización, causada en parte por el incremento de $[Ca^{2+}]_i$, puede explicar el efecto analgésico causado por capsaicina, el cual, paradójicamente, es contrario al efecto de 'dolor' e inflamación neurogénica que se le atribuye.^[1]

En vías áreas existen varios mediadores endógenos que pueden activar a TRPV1; la bradicinina es un mediador primordial liberado en vías aéreas inflamadas, es capaz de activar los receptores mencionados en neuronas aferentes bronquiales debido a la generación de fosfolipasa A2 y productos de la lipooxigenasa, las cuales pueden sensibilizar a TRPV1; esta sensibilización también puede ocurrir por mediación de fosfolipasa C, proteínkinasa C (PKC) dependiente o PKC independiente.^[18] En cuanto a la tos, hay estudios clínicos que demuestran que la sensibilidad disminuye al suministrar capsaicina vía oral a los sujetos de estudio debido a la desensibilización periférica de los receptores en vías aéreas, además de una sobreexpresión de TRPV1; aunque se reporta también que la disminución del reflejo de tos podría atribuirse a la presencia de TRPV1 en el sistema nervioso central.^[19, 20]

La piperina, con el nombre químico de 1-pepiroilpiperidina, es el alcaloide pungente principal contenido en los granos derivados del fruto de *Piper nigrum*. La pimienta es usada como especia y sazónador en la dieta.^[21] A la piperina se le han encontrado varias aplicaciones además de sus propiedades culinarias; entre ellas está su actividad antioxidante que deriva en beneficio a la salud en contraste con los efectos de una dieta alta en grasas; también se han reportado sus propiedades antidiarréicas y gastroprotectoras en roedores.^[22]

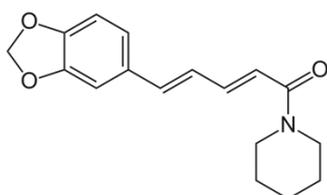


Figura 3. Estructura de la piperina

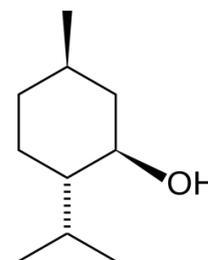
Entre los usos medicinales de la piperina están los tratamientos para: dolor muscular, escalofríos, resfriado común, fiebres, estimulador de apetito y como promotor de la peristaltis.^[23] Estudios de biodisponibilidad han demostrado que la piperina es rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal y que la vía mayoritaria de

excreción de sus metabolitos son los riñones. Debido a su capacidad de inhibir el CYP3A4 en humanos, así como la glicoproteína-P, también se reconoce como un agente adyuvante para mejorar la biodisponibilidad de otros fármacos. [24] A pesar de que se ha indicado que la capsaicina y piperina presentan diferencias sensoriales cuantitativas y cualitativas, ambos compuestos poseen propiedades similares. [25]

Al igual que la capsaicina, se ha descrito que actúa sobre los TRPV1; y pese a no ser un vainillósido, también se ha definido como un agonista de estos receptores. En técnicas de electrofisiología, la piperina ha resultado ser más eficaz pero menos potente que la capsaicina en los TRPV1 de humanos, lo cual es consistente con el umbral de la pungencia relativa de la capsaicina (0.6 μM) en comparación con la piperina (10.5 μM); también se demostró que la piperina produce una mayor desensibilización y taquifilaxia en el receptor en comparación con capsaicina. Sin embargo, aunque se ha estudiado el efecto de varios agonistas sobre los TRPV1, ninguno ha demostrado ser más eficaz que la capsaicina en cuanto el efecto contráctil en músculo liso, incluso no se ha dilucidado si estos resultados pueden deberse a que ambos compuestos tienen diferentes sitios de unión en los receptores. [25]

El mentol es un alcohol monoterpenoide cíclico el cual se encuentra en grandes proporciones en el aceite esencial de la menta (*Mentha piperita*), comúnmente usado en la medicina tradicional para tratar desórdenes gastrointestinales como náusea, vómito y síndrome de intestino irritable. [26] El mentol es ampliamente consumido por sus propiedades sensoriales, incluso es utilizado como excipiente en medicamentos destinados para aliviar dolores, comezón o tos. Tiene la capacidad de activar el TRPM8, lo cual resulta en una corriente catiónica no selectiva. Este canal es permeable a sodio (Na^+), potasio (K^+), cesio (Cs^+) y calcio (Ca^{2+}), lo que conduce a un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además de esto, la activación de TRPM8 demuestra que existe una despolarización de más de 60 mV. [27] Al ser un ligando de TRPM8, el mentol tiene como aplicación terapéutica potencial el ser adyuvante en el tratamiento de cáncer de próstata y de hiperplasia prostática benigna, pues hay estudios que indican que puede inducir la apoptosis en células relacionadas a estos padecimientos; para cistitis intersticial se ha comprobado que una administración intravesical de mentol en ratas hembras genera un aumento de la presión al orinar y una disminución en el umbral de volumen para la micción.

Figura 4. Estructura del mentol



Sin embargo es menester decir que también se ha demostrado en varios estudios que el mentol de los cigarrillos mentolados es un exacerbante de la adicción a la nicotina, pues al proveer la sensación de «frescura» y poseer una actividad contra la irritación, contrarrestan los efectos del humo del cigarrillo. Se cree que el rápido efecto del mentol al inhalar el humo de cigarrillo se debe a la localización de los TRPM8 en la región del nervio mandibular el cual enerva la lengua. [28] También se ha demostrado en estudios con animales de laboratorio que el mentol contiene propiedades antitusivas en una reducción de la tos dosis-dependiente, asimismo se comprobó un aumento en la latencia de la tos en los animales que mostraron atenuación de ésta. En el mismo estudio se describe que los modelos biológicos presentaron una alta variación en la respuesta debido a la tolerancia o taquifilaxia que presentaban. Es importante destacar que está descrito que el mentol no es un agonista selectivo a TRPM8, sino que puede también activar o inhibir el TRPA1, dependiendo de la concentración, y también es activador del TRPV3. [29]

El timol es un monoterpene fenólico el cual se obtiene del tomillo (*Thymus vulgaris*) y el orégano (*Origanum vulgare*). Está descrito que se comporta como un agonista promiscuo de los canales TRP, pues activa TRPA1, TRPM8 y TRPV3. [30]

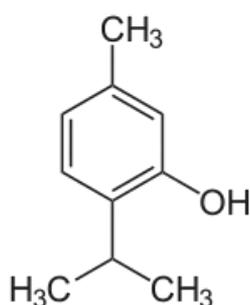


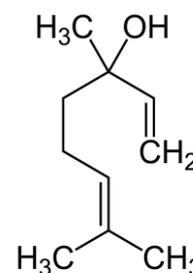
Figura 5. Estructura del timol.

Si bien la capsaicina ocasiona una sensación de picor y el mentol una sensación de frescura, pero el timol, a pesar de que también es un alcohol monoterpene como el segundo, no ocasiona ninguno de estos efectos, sino una mezcla de caliente-fresco-amargo. Los mecanismos moleculares para que ocurra esto no están del todo dilucidados. En el epitelio lingual y nasal hay una gran expresión del TRPV3, lo cual se

cree está involucrado en la sensación organoléptica y en la sensibilización de las neuronas somatosensoras aferentes. ^[31] Al igual que el mentol, el timol ha sido parte de importante de la medicina tradicional; se le han atribuido propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. También se ha descrito que modula el transporte mucociliar, a los receptores β_2 y que presenta un efecto benéfico la tos de niños con bronquitis aguda. Pese a que se sabe que la tos es un efecto vagal, se cree que pueda estar regulada parcialmente al unirse a los TRPV3. Pese a que no hay evidencia de co-expresión de TRPM8 y TRPV3 en tejido, y que la activación de cada canal presente efectos diferentes, se comprobó que ambos receptores modulan la tos por vía sistema olfatorio y trigeminal. ^[32] En estudios *in vitro* en músculo liso de estómago de cobayo, se encontró que el timol presenta al menos 2 mecanismos de acción dependiendo de la dosis. A concentraciones bajas, entre 3×10^{-8} y 2×10^{-7} M, el timol ejerce un efecto excitatorio o de contracción alcanzando el 15 % de la contracción máxima ocasionada con ACh. El otro efecto del timol, el cual se presenta a concentraciones de 10^{-6} y 10^{-4} M, muestra que no se inhibe el efecto de contracción, sino que conlleva, además, a una inhibición total. Se demostró que el efecto de contracción está ligado a los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos, y también a los receptores β_2 adrenérgicos. ^[33]

El linalool, también llamado coriandriol, es un monoterpeno aromático comúnmente encontrado como componente volátil principal en los aceites esenciales de varias plantas aromáticas como la bergamota, lavanda y jazmín. Al ser un compuesto aromático es usado en cosméticos, fragancias finas, jabones, entre otros. ^[34] Estudios han reportado que entre sus propiedades farmacológicas se encuentran ser analgésico y antinociceptivo; también se ha descrito que administrado por vía oral ha inhibido edemas inducidos por carrageninas, además de tener la capacidad de disminuir la hiperalgesia térmica inducida por esta misma mezcla de polisacáridos, L-glutamato y prostaglandina E_2 .

Figura 6. Estructura del linalool



El linalool también ha demostrado tener la capacidad de atenuar distintas respuestas de dolor generadas por un estímulo nocivo de naturaleza química, como el ácido acético, o uno de naturaleza física, como el calor. ^[35] Se han propuesto varios sitios de

acción en los que puede actuar el linalool, sin embargo, estudios recientes han demostrado que el efecto nociceptivo del linalool se debe a la inhibición conjunta de los receptores ionotrópicos de glutamato y a los canales TRPA1. [36] Esto ha abierto la posibilidad para estudiar esta propiedad en condiciones clínicas, como es el caso de la fibromialgia (caracterizado por dolor muscular crónico de origen desconocido), sabiendo de las limitaciones que los monoterpenos presentan: baja solubilidad en agua y vida media muy corta. [37] Otros trabajos experimentales han demostrado que, pese a no ser activadores tan potentes de TRPM8 como la icilina o el mentol, el linalool sí presenta actividad sobre este canal con una potencia de alrededor de 20 % con respecto a la icilina. Aún así, en este mismo estudio se comprobó que el linalool, además de generar sensación de frescura, posee actividad analgésica *in vivo*, sugiriendo que los TRPM8 poseen un papel en el alivio del dolor. [38]

3.6 Agonismo y antagonismo, efecto aditivo y sinergia

La afinidad farmacológica es una medida de la atracción de un ligando por su blanco biológico o molecular. Esta unión puede ser agonista, lo que quiere decir que un compuesto puede unirse a su receptor que dirige a un estímulo del proceso de señalización asociado a ese receptor. También puede ser antagonista, lo que significa que el compuesto que se une al receptor inhibe la estimulación generada por la unión del agonista-receptor asociada, esto sin afectar la señalización independiente del agonista; esto significa que los compuestos antagonistas carecen del efecto de señalización en contraparte de los compuestos agonistas. La afinidad puede cuantificarse utilizando la constante de equilibrio de disociación, la cual se define como la relación de la velocidad en la que el ligando se acerca al sitio de unión de la proteína, y la tasa en la que éste se disocia del mismo. La base para el cálculo de la afinidad k_2/k_1 denominada K_A , viene de la ecuación de acción de masas, la cual define ρ_A , la cual es la fracción disponible de sitios de unión a una concentración del ligando [A]:

$$\rho_A = \frac{[A]B_{m\acute{a}x}}{[A] + K_A}$$

Donde $B_{m\acute{a}x}$ es el máximo número de sitios de unión y K_A la constante del equilibrio de disociación del complejo ligando-receptor. Esta ecuación es simple y ha sido muy útil en el

área de la farmacología, sin embargo, tiene sus limitaciones. En la célula hay proteínas que transmiten varias señales químicas entre el espacio extracelular y el citosol. Esto significa que las proteínas no permanecen en conformación estática, sino que más bien se ensamblan en distintas conformaciones de acuerdo al estímulo, lo que indica que el o los sitios de unión no son homogéneos. Esto también quiere decir que si el ligando promueve un cambio conformacional en su receptor que reacciona con una proteína de señalización o algún otro cuerpo celular, incluso si la unión del ligando promueve la estabilización de otra conformación, entonces la afinidad observada de ese ligando puede ser dependiente de este proceso. Los ligandos extracelulares como las hormonas o neurotransmisores estabilizan las conformaciones de los receptores para luego promover la unión y la activación de proteínas de señalización; a esta función se le llama alosterismo, y este puede alterar la afinidad de unión del ligando al unírsele en otros *loci*. Al considerar estas uniones alostéricas y distintas conformaciones posibles del receptor, la ecuación anterior se vuelve más compleja. ^[39]

A lo largo de la historia se han utilizado combinaciones de plantas con principios biológicamente activos, fármacos y medicamentos con el fin de mejorar y aliviar las patologías y sus síntomas. ^[40] En la medicina moderna, el combinar medicamentos tiene como objetivo el alcanzar el efecto terapéutico de sinergia, reducción de dosis y toxicidad, y minimizar o retardar la inducción de resistencia al fármaco; estos 2 últimos beneficios pueden derivarse del efecto mismo de sinergia. Sin embargo, no existe una definición estandarizada o bien definida de lo que es sinergia, pues los autores tienen distintos puntos de vista; incluso instancias gubernamentales como la FDA no tienen bases para poder regular el significado de sinergia. A lo largo de los años, los autores Tin-Chao Chou y Paul Talalay introdujeron entre 1983 y 1984 el término 'índice de combinación' (IC) para poder representar cuantitativamente sinergismo (cuando $IC < 1$), efecto aditivo (cuando $IC = 1$), y antagonismo (cuando $IC > 1$). Para estas aplicaciones, ambos obtuvieron la ayuda de Joseph Chou, quien desarrolló el software de primera generación para el análisis dosis-efecto basada en la ley de acción de masas. ^[41]

La ecuación de la mediana del efecto y el índice de combinación-análisis isoblográfico son utilizados para el análisis de la interacción. Esta ecuación, basada en la ley de acción de masas, establece que hay una relación inequívoca entre la dosis y el efecto, los cuales son independientes del número de fármacos y mecanismos de acción involucrados. Para

esto se grafican las curvas dosis-efecto de cada fármaco y sus combinaciones en cada una de las concentraciones diluidas utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m$$

Donde D es la concentración, D_m es la concentración del efecto mediano, fa es la fracción afectada por la concentración D , fu es la fracción no afectada (por lo que $fa = 1 - fu$), y el exponente m significa la forma o la sigmoidicidad de la curva concentración-respuesta, la cual es la pendiente de la curva del efecto mediano: $m = 1$, hiperbólica; $m > 1$, sigmoidal; $m < 1$, sigmoidal negativa. También se toma en cuenta los parámetros potencia (D_m) y forma (m). Reordenando la ecuación anterior, tenemos:

$$D = D_m \left[\frac{fa}{1 - fa} \right]^{1/m}$$

La D_m y m para cada fármaco se determina por la gráfica del efecto mediano $\log(D)$ versus $\log(fa/fu)$, m es la pendiente y el $\log(D_m)$ es el intercepto de la abscisa. La conformidad de los datos al principio del efecto mediano está manifestado por el coeficiente de correlación lineal (R) de esta gráfica. Para calcular el efecto de sinergia o efecto aditivo a x % de efecto de contracción para cada IC, se utiliza la ecuación:

$$IC = \frac{D_1}{Dx_1} + \frac{D_2}{Dx_2}$$

Un isoblograma normalizado de la CE_{50} se construye al graficar $(D)_1/(CE_{50})_1$ del fármaco 1 en función de $(D)_2/(CE_{50})_2$ para el fármaco 2. En esta gráfica, las isobolas son simétricas, y el rango de valores está entre 0 y 1 en ambos ejes. Estas isobolas son independientes de la forma de las curvas dosis-efecto, del mecanismo de acción o de las características del fármaco. Si la combinación de los datos cae en la hipotenusa, esto indica un efecto aditivo; si los datos caen en la parte inferior izquierda de la gráfica, esto

indica sinergismo; y si los datos caen en la parte superior derecha, indica antagonismo. El índice de reducción de dosis (IRD) es una medida del número de veces que se reduce la dosis de cada fármaco involucrado en la combinación sinergista a un efecto dado comparado con las dosis de cada fármaco solo. El valor correspondiente para cada fármaco en una combinación está dada por la siguiente ecuación:

$$(IRD)_i = \frac{(D_m)_i [fa/(1 - fa)]^{1/m_i}}{(D)_i}$$

El IRD es importante en situaciones clínicas, en donde la reducción de la dosis lleva a la reducción de la toxicidad sin afectar la eficacia terapéutica. Es importante notar que aunque un IRD > 1 es benéfico, no necesariamente indica un efecto de sinergia. ^[42]

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la capsaicina y la piperina son agonistas de los canales TRPV1, cuya activación en músculo liso bronquial resulta en la contracción del mismo; sin embargo, no se ha demostrado el tipo de interacción que presentan al administrarse de manera concomitante. Del mismo modo, se ha descrito que el mentol relaja el músculo liso al unirse al TRPM8, pero no se ha demostrado la interacción que presenta al administrarse en conjunto con capsaicina, como también es el caso del linalool y el timol.

5. HIPÓTESIS

Dado que tanto la capsaicina como la piperina actúan sobre los canales TRPV1 generando un efecto de contracción, se plantea que añadidos simultáneamente potenciarán el efecto de contracción en el músculo liso de la tráquea aislada de cobayo, evidenciando la existencia de sinergia entre ambos principios activos.

De manera inversa, se espera que los monoterpenos linalool y timol, de manera similar al mentol, provoquen relajación con respecto a la contracción generada por capsaicina en el músculo liso bronquial, y por lo tanto tendrán un efecto de atenuación.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar tipo de interacción entre capsaicina y piperina, así como entre capsaicina y los monoterpenos mentol, timol y linalool en músculo liso de tráquea aislada de cobayo utilizando la ecuación del efecto mediano e índice de combinación-isobograma.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración efectiva 50 (CE_{50}) contráctil de capsaicina y de piperina.
- Determinar cuál es el efecto de los monoterpenos mentol, timol y linalool sobre músculo liso de tráquea de cobayo.
- Determinar el efecto de los monoterpenos sobre las contracciones inducidas por capsaicina en tráquea aislada de cobayo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivos

Para la disolución Krebs-Henseleit (KHS) se utilizaron las siguientes sales grado reactivo en las concentraciones indicadas: NaCl (120.0 mM), KCl (4.71 mM), CaCl₂•2H₂O (3.31 mM), MgSO₄•7H₂O (1.20 mM), NaH₂PO₄•H₂O (1.38 mM), NaHCO₃ (30.0 mM), glucosa (11.09 mM) y EDTA (0.06 mM). Los compuestos capsaicina, piperina, acetilcolina y carbacol se compraron de Sigma-Aldrich. El pentobarbital sódico fue comprado de Laboratorios Pisa. Los cristales de mentol utilizados son grado farmacéutico. El aceite de linalool utilizado fue extraído previamente en el Laboratorio 126 de la Facultad de Química por el método de arrastre de vapor por 3 horas utilizando un aparato modificado Clevenger de las semillas de *Bursera linanoe*. Los disolventes utilizados fueron agua destilada ultrapura (MiliQ), metanol y etanol grado reactivo.

7.2 Material biológico

Cobayos machos entre 350 y 450 g de peso con libre acceso a comida y agua, mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente a 22 °C). Los animales fueron adquiridos de Biosupply S.A. de C.V, cuidados y manejados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Cuidado y manejo de Animales. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio; además, se cuenta con la aprobación del protocolo por parte del CICUAL de la Escuela Superior de Medicina y Homeopatía del IPN (ENMH-CB-149-2015).

7.3 Procedimiento experimental

7.3.1 Disección de la tráquea y estabilización del tejido

Los animales se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico uso veterinario (150 mg/kg, i.p.), e inmediatamente se realizó la disección de la tráquea, limpiándola con cuidado del tejido conectivo circundante. Ésta se colocó en KHS, la cual se mantuvo a 37 °C con burbujeo constante de 5 % CO₂ y 95 % O₂. Posteriormente se cortan 8 anillos de

aproximadamente 2 mm de longitud y se colocan en la cámara de órgano aislado con 10 mL de KHS a la misma temperatura y con la misma saturación de oxígeno. El anillo se suspende con un 2 ganchos de alambre de Nicromel, donde uno está unido a la cámara y el otro está unido al transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado a un polígrafo Biopack MP100, en el cual el transductor de fuerza mide las contracciones y relajaciones del tejido. Los datos se procesan con el software Acqknowledge 3.8.2. El tejido se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se dejó estabilizar durante una hora, realizando lavados con la solución de Krebs-Henseleit cada 15 minutos durante ese periodo. Transcurrida la hora, se procedió a estimular el tejido con una solución de acetilcolina (ACh) 30 μ M 2 veces a intervalos de 30 minutos. Después de eso los órganos se lavaron 2 veces con la misma solución de Krebs y se permitió que el tejido se estabilizara durante 30 minutos más antes de comenzar los experimentos.

7.3.2 Evaluación de la contracción con capsaicina

Al tejido previamente preparado y estabilizado se le realizó una curva de contracción concentración-respuesta con concentraciones acumulativas con capsaicina desde 1×10^{-12} M hasta 1×10^{-4} M disuelta en agua con 2 gotas de tween 80 y etanol, con intervalos cada 3 minutos; en estas concentraciones se encontró la ventana de actividad biológica de su efecto (0 - 100 %). Para evaluar el efecto desensibilizador, se lavó el tejido después de la realización de la curva cada 15 minutos durante un periodo de 2 horas. El tejido no respondió a las posteriores estimulaciones, por lo que decretó como desensibilizado y no viable.

7.3.3 Evaluación de la contracción con piperina

En una serie de experimentos individuales, al tejido previamente preparado y estabilizado se le realizó una curva de contracción concentración-respuesta con concentraciones acumulativas con piperina desde 0.3 hasta 100 μ g/mL en agua con 2 gotas de tween 80 y etanol, con intervalos de 3 minutos; en estas concentraciones se encontró la ventana de actividad biológica de su efecto (0 - 100 %). Para evaluar el efecto desensibilizador, se lavó el tejido después de la realización de la curva cada 15 minutos durante un periodo de 2 horas. El tejido no respondió a las posteriores estimulaciones, por lo que se decretó como desensibilizado y no viable.

7.3.4 Evaluación del efecto inhibitorio de la contracción con capsaicina debido a la presencia de monoterpenos mentol, timol y linalool

En este experimento, al tejido previamente preparado y estabilizado, se agregaron soluciones repartidas en los canales de 10, 30, 100 y 300 µg/mL, de los monoterpenos: mentol, linalool y timol (en experimentos individuales) disueltos en agua con 2 gotas de tween 80 y metanol, se dejó incubar en los canales por 10 minutos y posteriormente se procedió a realizar la curva de contracción con capsaicina de la misma forma como se mencionó anteriormente.

7.3.5 Evaluación de relajación con mentol

En otro experimento individual, cuando el tejido alcanzó la contracción basal constante, se contrae con carbacol (CCh) hasta que llegue a la meseta de contracción; una vez en este punto se procede a realizar la curva de relajación acumulativa con la solución del mentol a concentraciones ascendentes 0.1 a 300 µg/mL con intervalos de 3 minutos. Posteriormente se realizan lavados, se deja reposar el tejido y se repite el procedimiento. En cada experimento se corrió un control, es decir, se adicionó únicamente el vehículo (agua con tween 80 y metanol) sin el mentol.

7.3.6 Evaluación de la interacción de capsaicina y piperina en su efecto de contracción

Para este experimento se utilizó la CE_{50} de la capsaicina ($5.777 \pm 0.062 \times 10^{-8}$ M) y la CE_{50} de la piperina ($1.592 \pm 0.065 \times 10^{-6}$ M), calculados con el software GraphPad Prism 5.0a, ajustados al modelo de la ecuación de Hill. La CE_{50} de cada compuesto se preparó y se hicieron diluciones con base en fracciones de la misma ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$, $1/128$, $1/512$, $1/1024$, $1/2048$). En el tejido previamente preparado y estabilizado se le realizó la curva de concentración-respuesta con concentraciones acumulativas, adicionando concentraciones simultáneas de cada compuesto en las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1 de piperina y capsaicina (Cuadros 1-3) a intervalos de 3 minutos, quedando en cámara concentraciones micromolares (µM).

Relación de compuestos

Fracción CE ₅₀	Cap 1 (μM)	Pip 1 (μM)	Suma (μM)
1	5.777 x 10 ⁻⁴	1.592 x 10 ⁻¹	1.59778 x 10 ⁻¹
1/2	2.8885 x 10 ⁻⁴	7.960 x 10 ⁻²	7.98889 x 10 ⁻²
1/8	7.2213 x 10 ⁻⁵	1.990 x 10 ⁻²	1.99722 x 10 ⁻²
1/32	1.8053 x 10 ⁻⁵	4.975 x 10 ⁻³	4.99305 x 10 ⁻³
1/128	4.5133 x 10 ⁻⁶	1.2438 x 10 ⁻³	1.24826 x 10 ⁻³
1/512	1.1283 x 10 ⁻⁶	3.1094 x 10 ⁻⁴	3.12066 x 10 ⁻⁴
1/1024	5.6416 x 10 ⁻⁷	1.5526 x 10 ⁻⁵	1.60898 x 10 ⁻⁵

Cuadro 1. Concentraciones utilizadas para la determinar la interacción entre los fármacos capsaicina (Cap) y piperina (Pip) en relación 1:1 con el efecto medio de cada uno y diluciones fraccionadas.

Relación de compuestos

Fracción CE ₅₀	Cap 3 (μM)	Pip 1 (μM)	Suma (μM)
1/2	2.1664 x 10 ⁻⁴	1.990 x 10 ⁻²	2.01166 x 10 ⁻²
1/8	5.4159 x 10 ⁻⁵	4.975 x 10 ⁻³	5.02916 x 10 ⁻³
1/32	1.3540 x 10 ⁻⁵	1.2438 x 10 ⁻³	1.25729 x 10 ⁻³
1/128	3.3850 x 10 ⁻⁶	3.1094 x 10 ⁻⁴	3.14322 x 10 ⁻⁴
1/512	8.4624 x 10 ⁻⁷	7.7734 x 10 ⁻⁵	7.85806 x 10 ⁻⁵
1/768	5.6416 x 10 ⁻⁷	5.1823 x 10 ⁻⁵	5.23871 x 10 ⁻⁵
1/1024	4.2312 x 10 ⁻⁷	3.8867 x 10 ⁻⁵	3.92903 x 10 ⁻⁵
1/2048	2.1156 x 10 ⁻⁷	1.9434 x 10 ⁻⁵	1.96452 x 10 ⁻⁵

Cuadro 2. Concentraciones utilizadas para la determinar la interacción entre los fármacos capsaicina (Cap) y piperina (Pip) en relación 3:1 con el efecto medio de cada uno y diluciones fraccionadas.

Relación de compuestos

Fracción CE ₅₀	Cap 1 (μM)	Pip 3 (μM)	Suma (μM)
1/2	7.2213 x 10 ⁻⁵	5.9700 x 10 ⁻²	5.97722 x 10 ⁻²
1/8	1.8053 x 10 ⁻⁵	1.4925 x 10 ⁻²	1.49431 x 10 ⁻²
1/32	4.5133 x 10 ⁻⁶	3.7313 x 10 ⁻³	3.73573 x 10 ⁻³
1/128	1.1283 x 10 ⁻⁶	9.3281 x 10 ⁻⁴	9.33941 x 10 ⁻⁴
1/512	2.8208 x 10 ⁻⁷	2.3320 x 10 ⁻⁴	2.33485 x 10 ⁻⁴
1/1024	1.4104 x 10 ⁻⁷	1.1660 x 10 ⁻⁴	1.16743 x 10 ⁻⁴

Cuadro 3. Concentraciones utilizadas para la determinar la interacción entre los fármacos capsaicina (Cap) y piperina (Pip) en relación 1:3 con el efecto medio de cada uno y diluciones fraccionadas.

7.4 Cálculo de parámetros y análisis estadístico

En cada caso se calculó la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) mediante el ajuste no lineal utilizando el modelo de Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) Sigmoide con el software GraphPad Prism 5.0a. Para determinar diferencias significativas se realizó un análisis de varianza de una vía para comparar entre tratamientos y de dos vías para comparar las curvas concentración-respuesta. Se consideró la significancia para un valor de $p \leq 0.05$ %.

Para el cálculo que decreta qué tipo de interacción existe entre ambos fármacos se utilizó el modelo matemático descrito por Chou y Talalay (1983 - 1984), en donde se determina la fracción afectada para cada fármaco (fa), el IC de cada una de las combinaciones utilizadas (1:1, 1:3 y 3:1) y se construyó la gráfica en función de la fracción afectada en cada combinación. Asimismo se grafica un isoblograma normalizado para poder distinguir el efecto teórico del experimental que presenta cada combinación. Chou-Talalay describieron que existe sinergismo entre los fármacos cuando IC es menor a 1, efecto aditivo cuando IC es igual a 1, y antagonismo cuando IC es mayor a 1. Una representación visual y simplificada se puede realizar al trazar un isoblograma normalizado en donde se comparan los efectos teóricos con los efectos experimentales obtenidos.

8. RESULTADOS

El efecto de contracción de la capsaicina ($CE_{50} = 5.777 \pm 0.062 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) y la potencia ($E_{\text{máx}} = 1.082 \pm 0.050 \text{ mM}$) difiere al de la piperina ($CE_{50} = 1.592 \pm 0.065 \times 10 \mu\text{M}$) con potencia ($E_{\text{máx}} = 0.201 \pm 0.043 \text{ mM}$), la primera presenta su efecto a concentraciones más bajas que la segunda (Figura 7), en 3 órdenes de magnitudes logarítmicas, lo que concuerda con lo ya descrito en la literatura. ^[43, 44] También puede apreciarse que la piperina presenta una pendiente más pronunciada que la de capsaicina, esto es, llega al efecto máximo más rápidamente, por lo que pareciera ser más afín a su receptor.

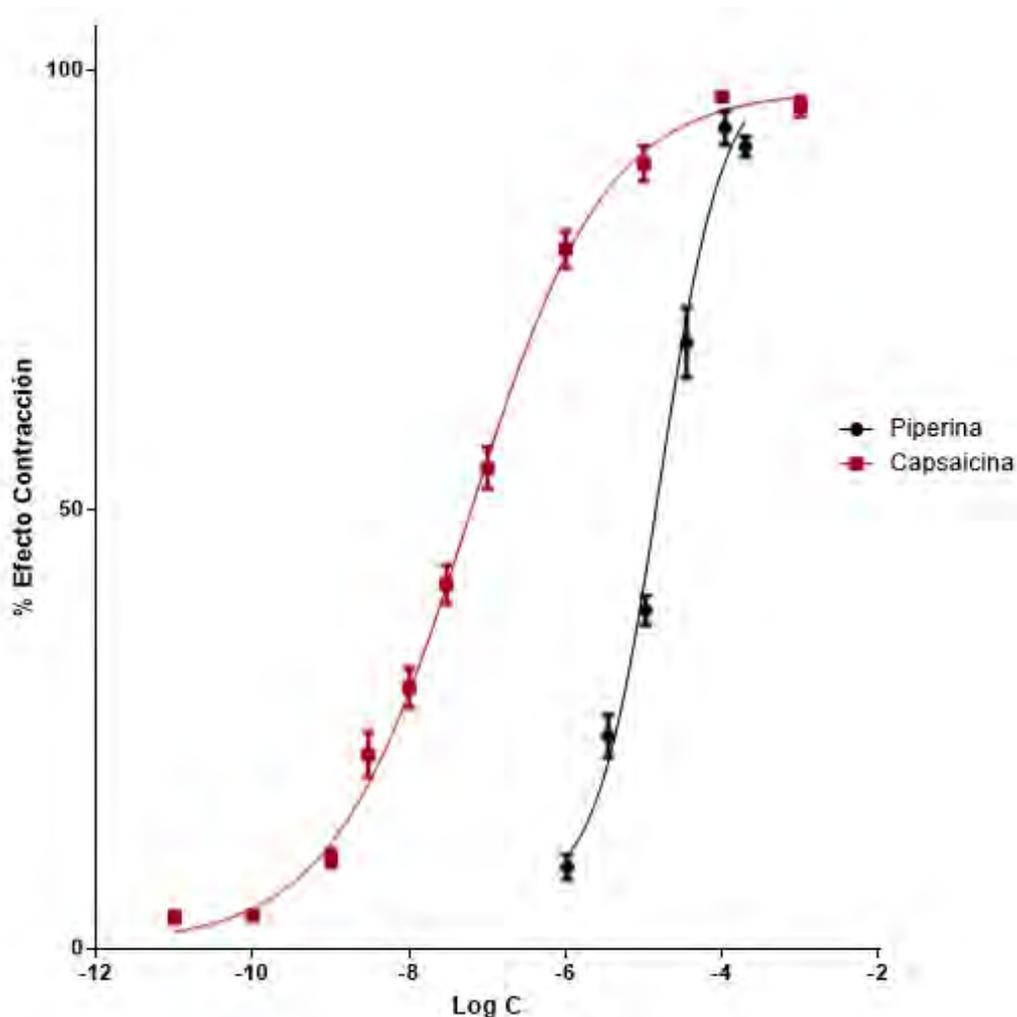


Figura 7. Curvas de concentración-respuesta de contracción de capsaicina (rojo) y piperina (negro). Se muestran los resultados donde cada símbolo corresponde a la media \pm EEM (error estándar de la media) y la línea continua al ajuste no lineal de la ecuación de Hill de al menos 6 experimentos ($n = 6$). Cada curva representa el efecto máximo (100 % de efecto) logrado con respecto a cada compuesto individual.

Una vez estandarizadas las curvas, se procedió a realizar el experimento de interacción con monoterpenos. En la Figura 8 se muestran los resultados del experimento con diferentes concentraciones de soluciones de linalool; en las primeras 3 concentraciones se observa una tendencia de atenuación de la concentración máxima ocasionada por capsaicina en presencia y en ausencia de linalool, y en la concentración más elevada (300 µg/mL) existe la misma atenuación que a la concentración más baja (10 µg/mL).

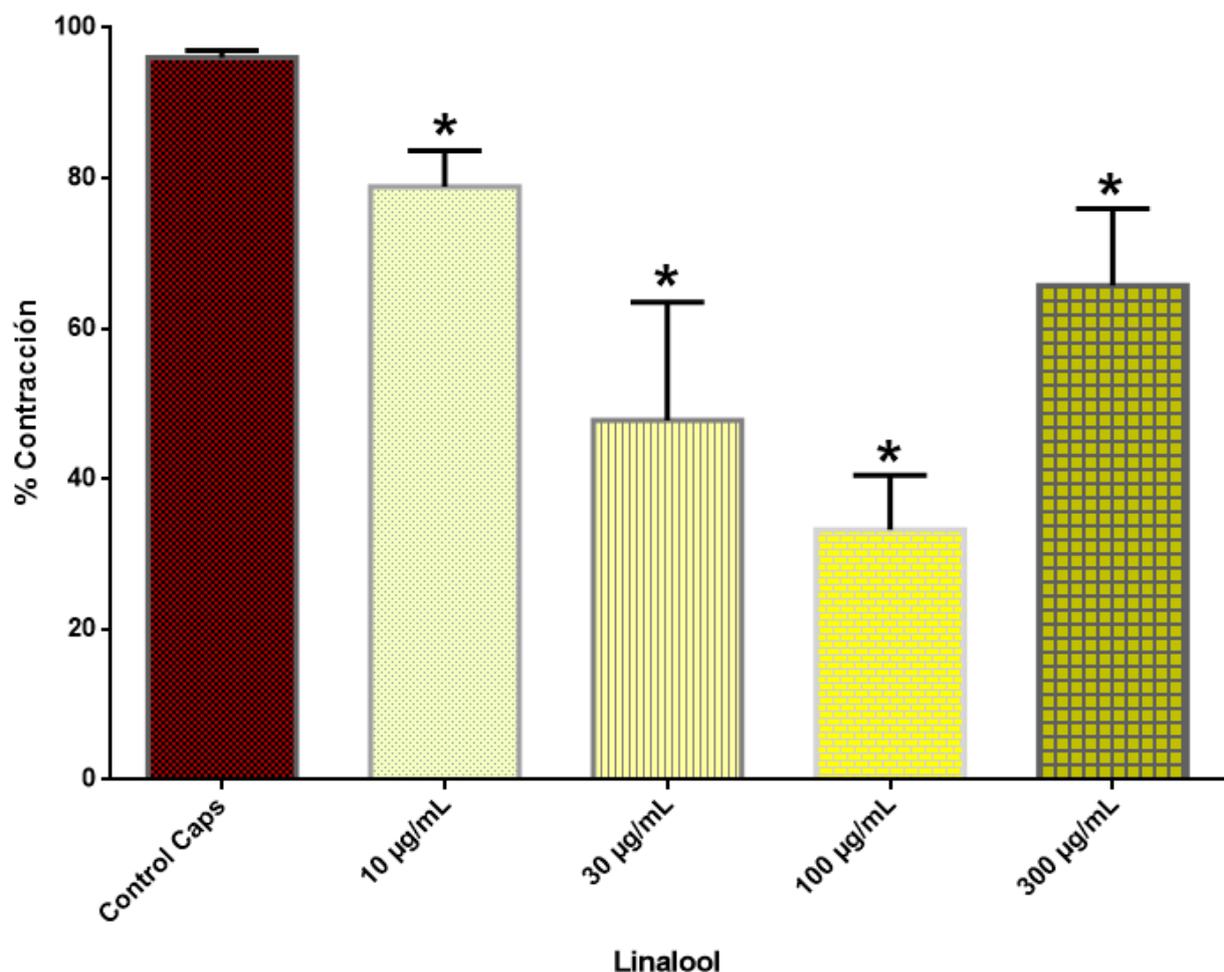


Figura 8. Contracción máxima ocasionada por capsaicina en ausencia y en presencia de distintas concentraciones del aceite de linalool. Se muestran los resultados de la media \pm EEM del efecto máximo contráctil de al menos 6 experimentos ($n = 6$); * $p < 0.05$ en un análisis de varianza seguido por una prueba de Dunnett.

Se realizó el mismo experimento anterior, ahora utilizando al timol como agente que interacciona con capsaicina. En las primeras 3 concentraciones puede apreciarse un abatimiento total de la contracción generada con capsaicina (10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sin embargo, en la concentración más alta (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) el efecto de atenuación ya no es significativo. Es importante mencionar que a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se ve un efecto relajante (Figura 9).

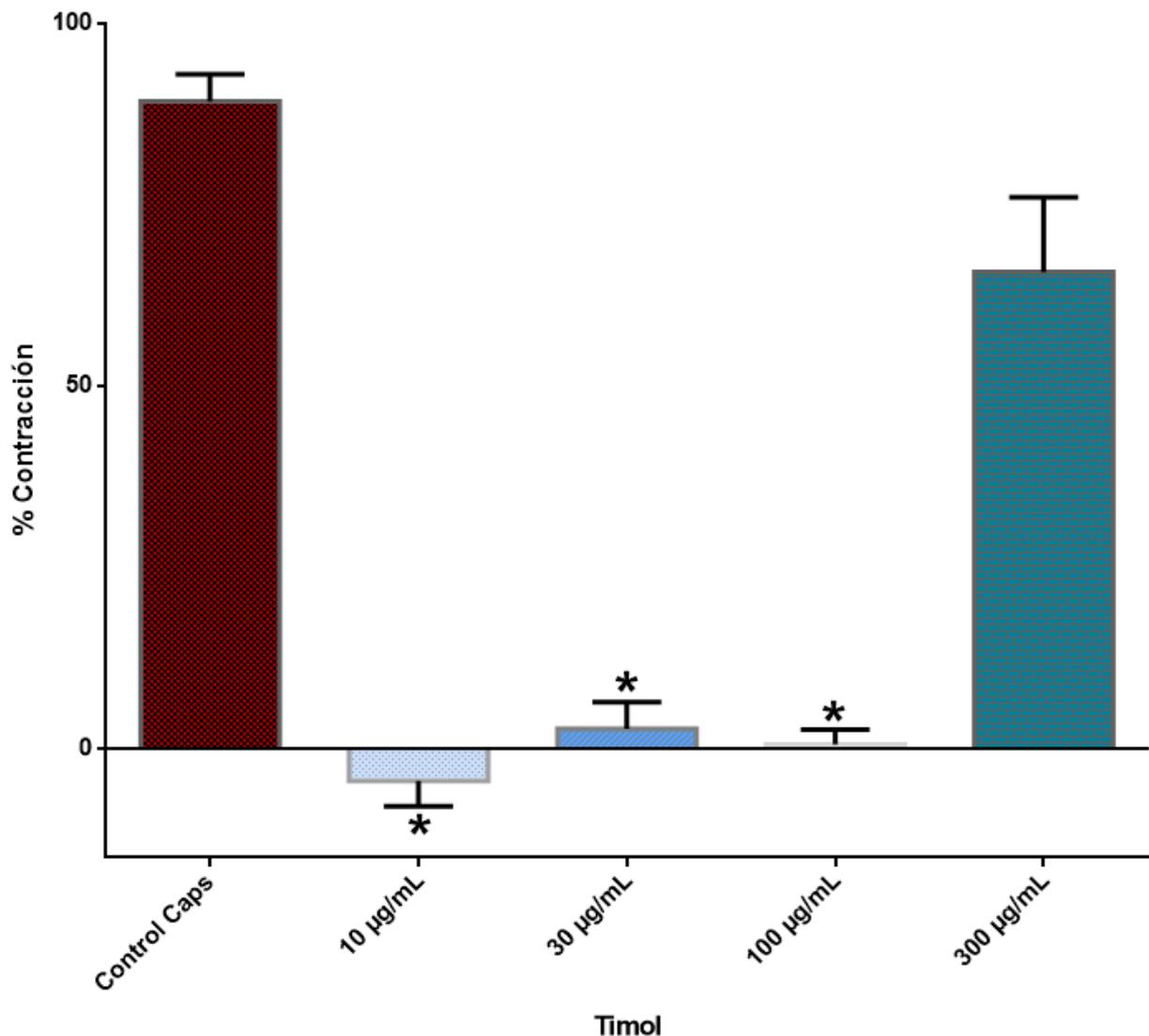


Figura 9. Contracción máxima ocasionada por capsaicina en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de la solución de timol. Se muestran los resultados de la media \pm EEM del efecto máximo contráctil de al menos 6 experimentos ($n = 6$); * $p < 0.05$ en un análisis de varianza seguido por una prueba de Dunnett.

Se realizó otro experimento de interacción con mentol sobre la contracción máxima obtenida con capsaicina en presencia y en ausencia del monoterpeno (Figura 10). Aquí la concentración más baja (10 $\mu\text{g/mL}$) de mentol presenta un efecto de atenuación mayor que la siguiente concentración (30 $\mu\text{g/mL}$), que a su vez presenta un efecto de atenuación menor que la siguiente concentración (100 $\mu\text{g/mL}$). En la concentración más alta (300 $\mu\text{g/mL}$) puede apreciarse que no existe efecto de contracción por capsaicina, sino que el tejido presenta un efecto de relajación significativo.

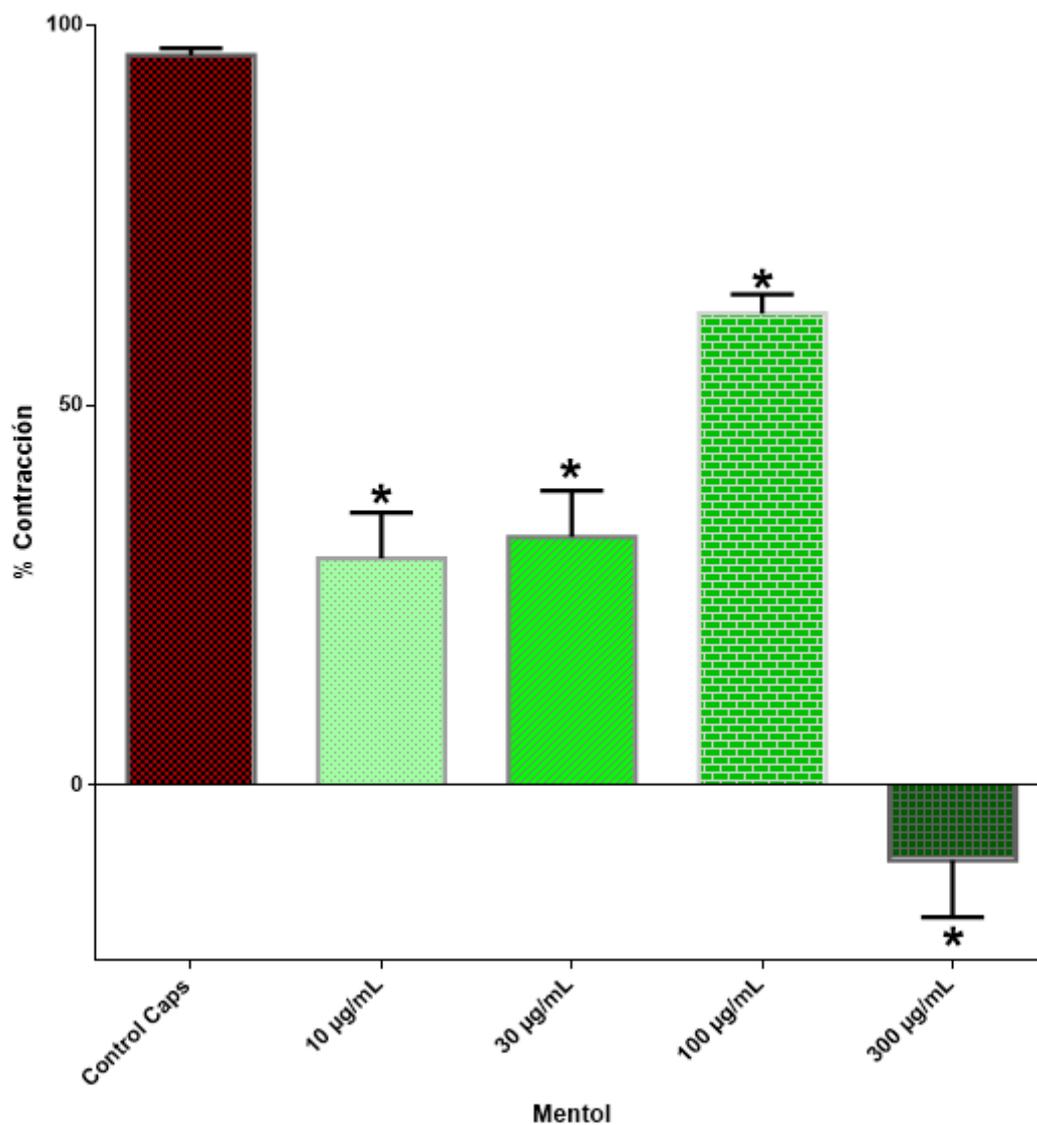


Figura 10. Contracción máxima ocasionada por capsaicina en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de la solución de mentol. Se muestran los resultados de la media \pm EEM del efecto máximo contráctil de al menos 6 experimentos ($n = 6$); * $p < 0.05$ en un análisis de varianza seguido por una prueba de Dunnett.

Al momento de la adición de las soluciones de los monoterpenos se observó que la tensión del tejido disminuye Figura 11.



Figura 11. Registro del polígrafo de un canal donde se observa la relajación al añadir el monoterpeno.

En la Figura 12 puede notarse el efecto de relajación sobre el tejido a distintas concentraciones de linalool, timol y de mentol.

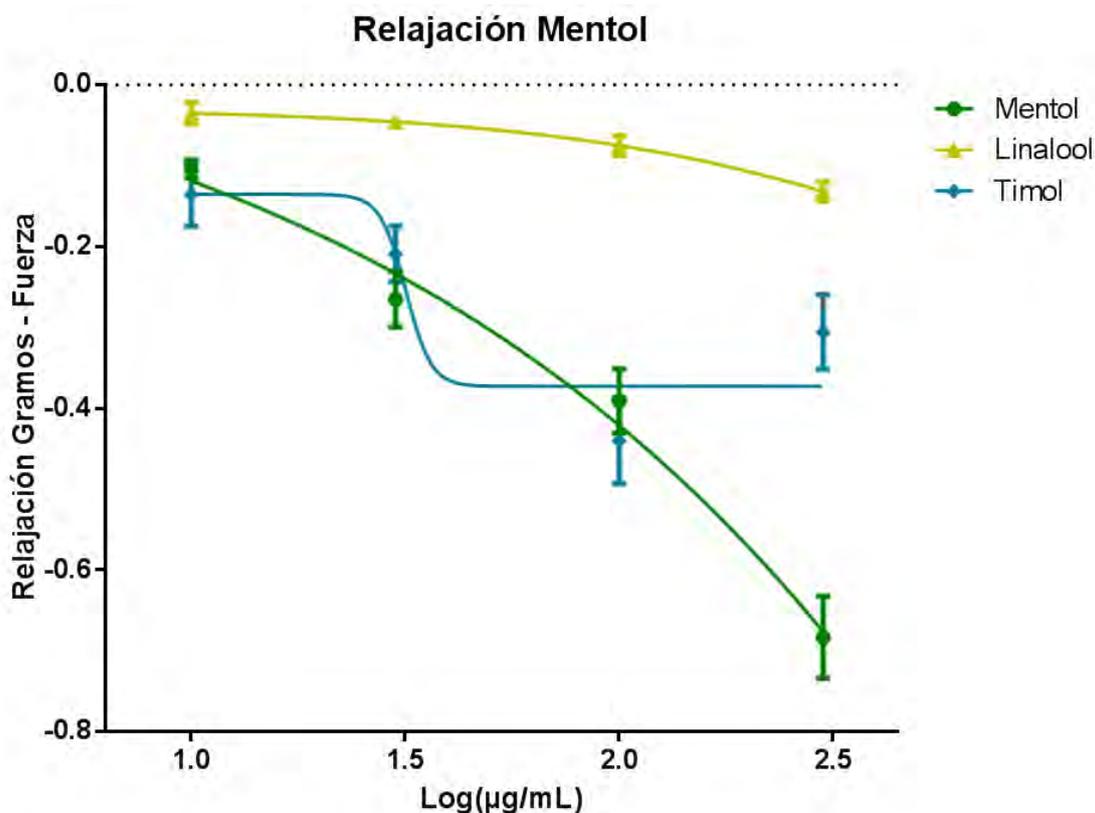


Figura 12. Curva de relajación del mentol (verde), el linalool (amarillo) y el timol (azul) de las 4 concentraciones utilizadas (10, 30, 100 y 300 $\mu\text{g/mL}$) en el estudio de interacción de capsaicina y monoterpenos. Cada punto representa la media del efecto de las concentraciones \pm EEM, la línea continua representa el ajuste no lineal de la ecuación de Hill de al menos 6 experimentos ($n = 6$).

Dado que el mentol presenta un mayor efecto de relajación que el linalool, se realizó una curva de relajación tras contraer con CCh (3 μ M) como se muestra en la Figura 13. El efecto de relajación del mentol fue de $CE_{50} = 130.5 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$.

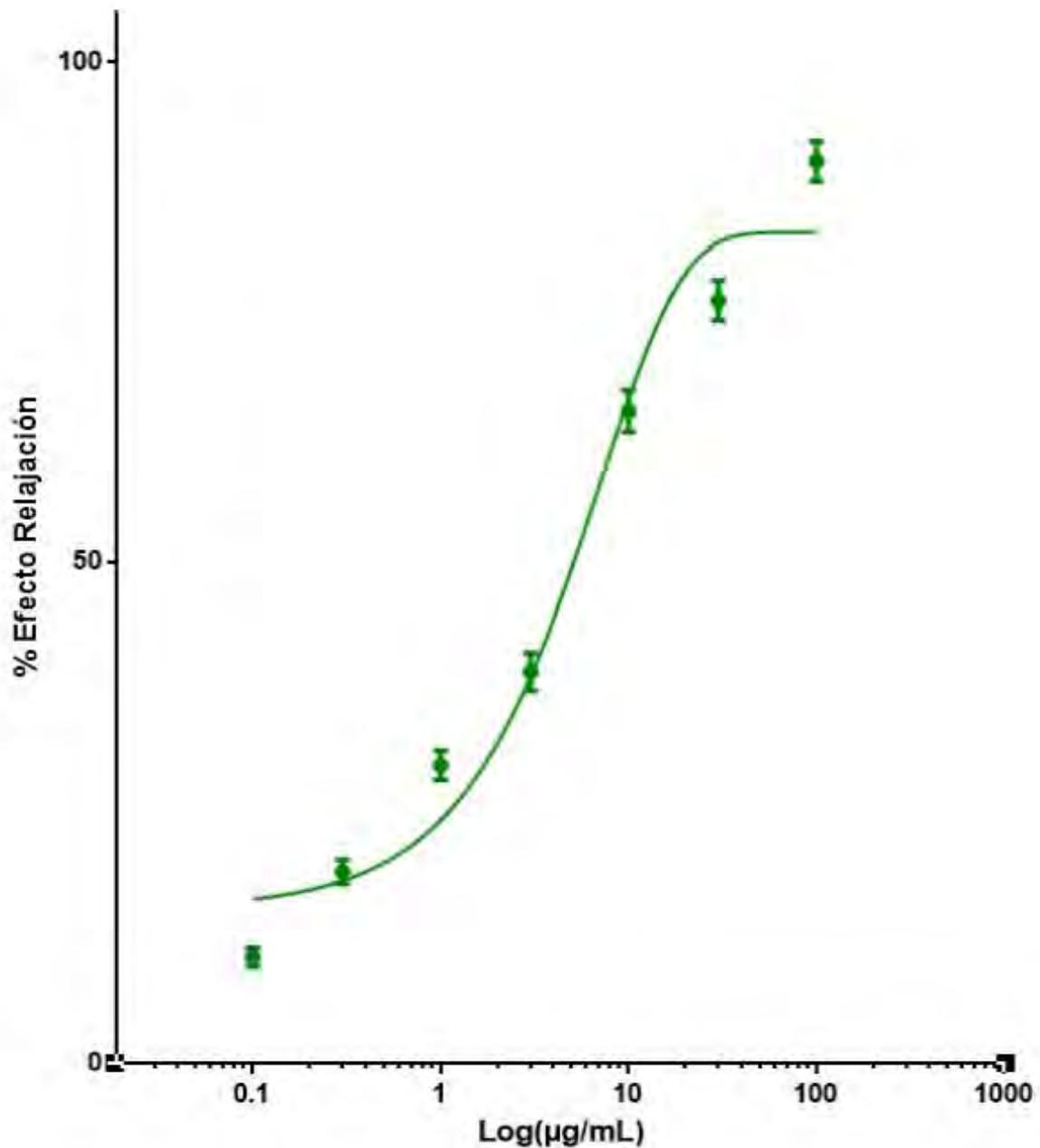


Figura 13. Curvas de concentración-respuesta de relajación ocasionada por mentol. Se muestran los resultados donde cada símbolo corresponde a la media \pm EEM, y la línea continua al ajuste no lineal de la ecuación de Hill de al menos 6 experimentos ($n = 6$).

Finalmente se realizó el experimento de la interacción entre capsaicina y piperina. En la Figura 14 pueden observarse las curvas individuales de capsaicina y piperina mostradas previamente y las curvas de ambos compuestos en las combinaciones fijas 1:1, 3:1 y 1:3. Es evidente que las combinaciones presentan un efecto a concentraciones menores que los compuestos individuales, igualmente llegan a un efecto de taquifilaxia mucho antes (datos no mostrados). También es importante denotar que ninguna de las combinaciones supera el efecto máximo de contracción ocasionado por capsaicina administrada individualmente.

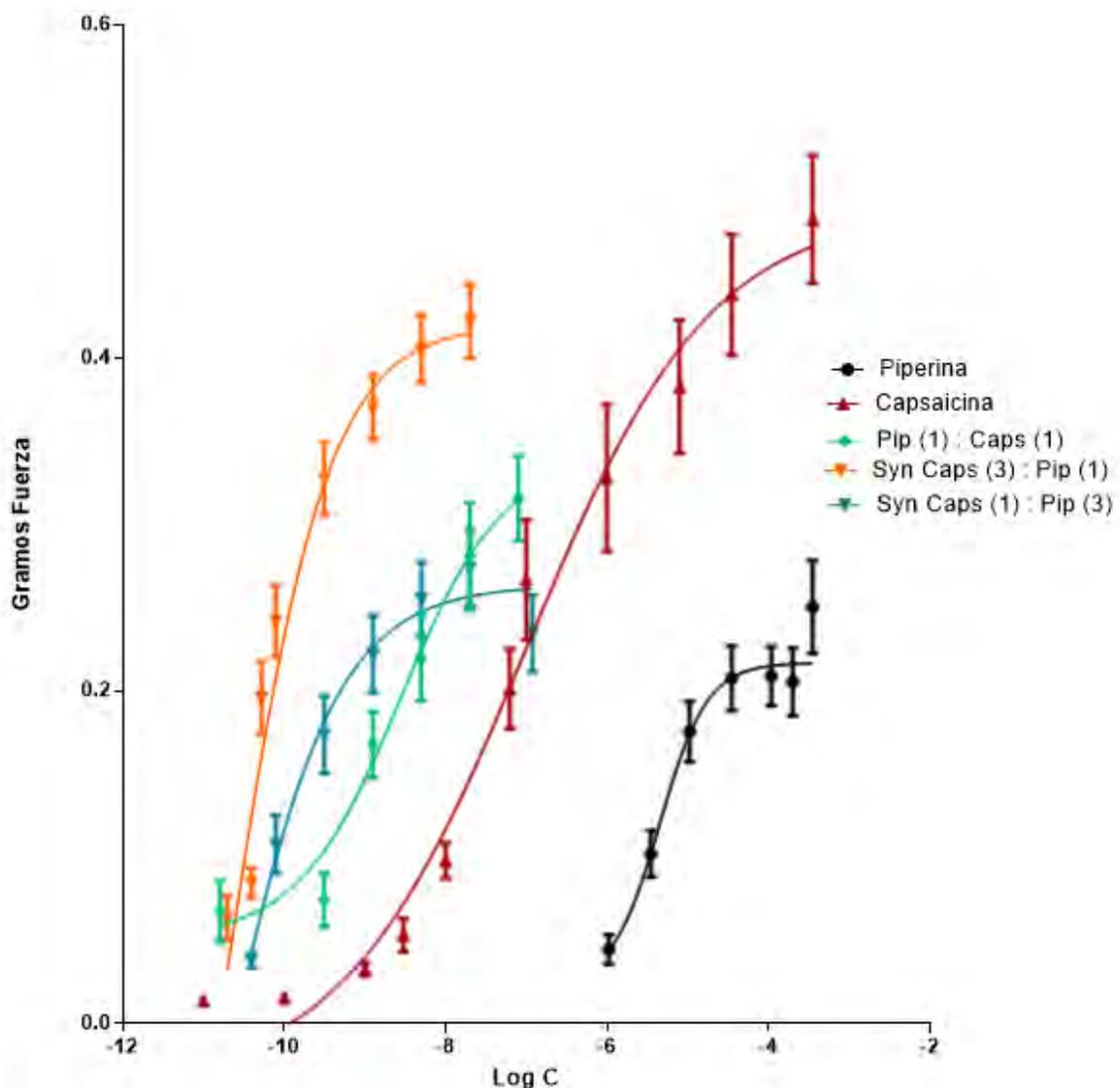


Figura 14. Curvas de concentración-respuesta de contracción (M) en gramos-fuerza de capsaicina (rojo), piperina (negro), capsaicina + piperina 1:1 (verde), capsaicina + piperina 3:1 (anaranjado) y capsaicina + piperina 1:3 (azul). Se muestran los resultados donde cada símbolo corresponde a la media \pm EEM (error estándar de la media) y la línea continua al ajuste no lineal de la ecuación de Hill de al menos 6 experimentos ($n = 6$). Cada curva representa el efecto máximo (100 % de efecto) logrado con respecto a cada compuesto individual.

En la Figura 15 se observa el mismo experimento, únicamente se cambió el eje de las ordenadas al porcentaje de efecto de contracción con respecto a cada curva.

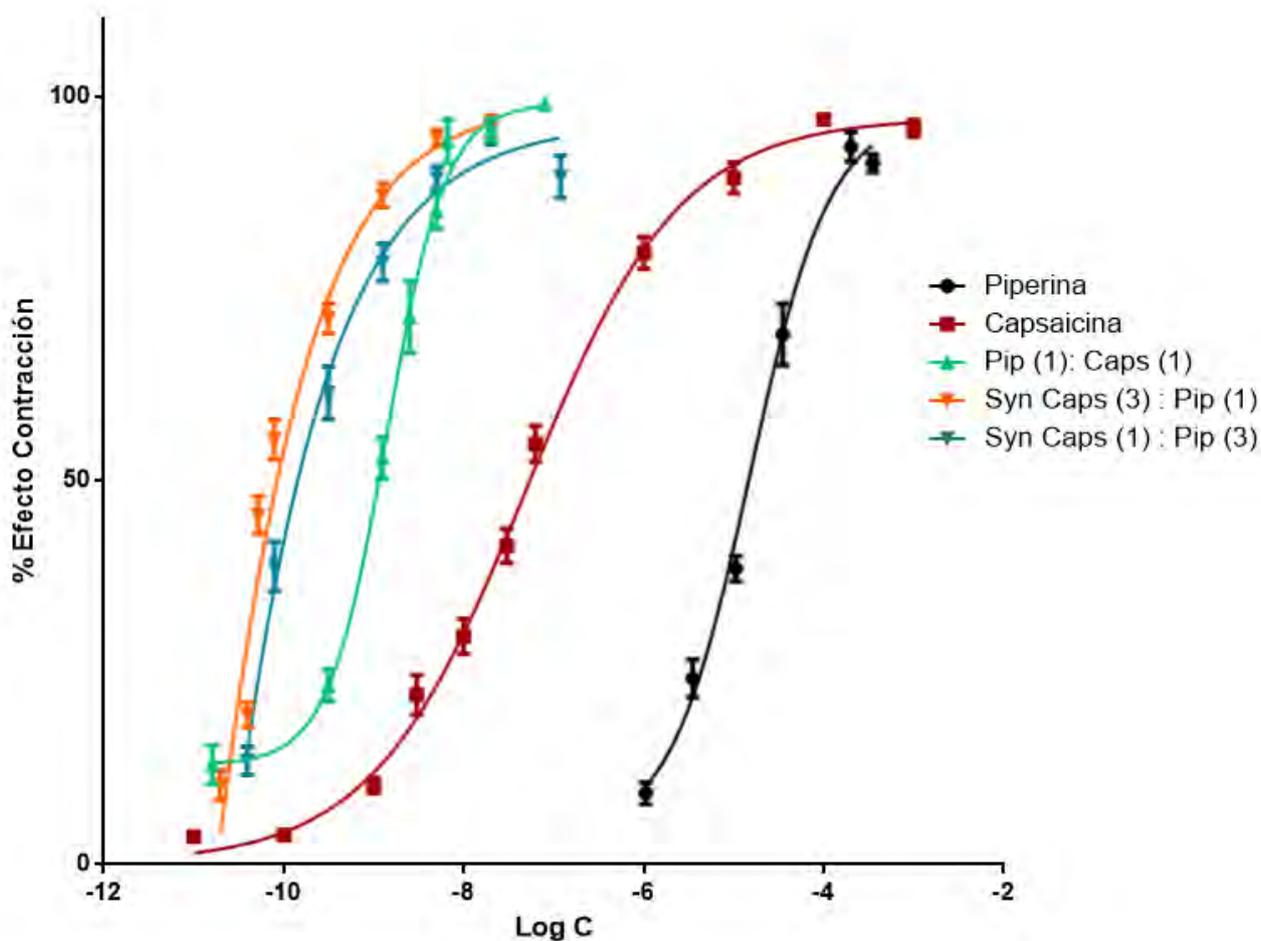


Figura 15. Curvas de concentración-respuesta de contracción (M) en porcentaje de efecto de capsaicina (rojo), piperina (negro), capsaicina + piperina 1:1 (verde), capsaicina + piperina 3:1 (anaranjado) y capsaicina + piperina 1:3 (azul). Se muestran los resultados donde cada símbolo corresponde a la media \pm EEM (error estándar de la media) y la línea continua al ajuste no lineal de la ecuación de Hill de al menos 6 experimentos ($n = 6$).

En la Figura 16 se observa la transformación de las curvas concentración-respuesta de contracción sigmoides por la ecuación del efecto mediano; para de esta forma poder calcular los parámetros de la curva concentración-efecto de los fármacos individuales (D_m , m y r).

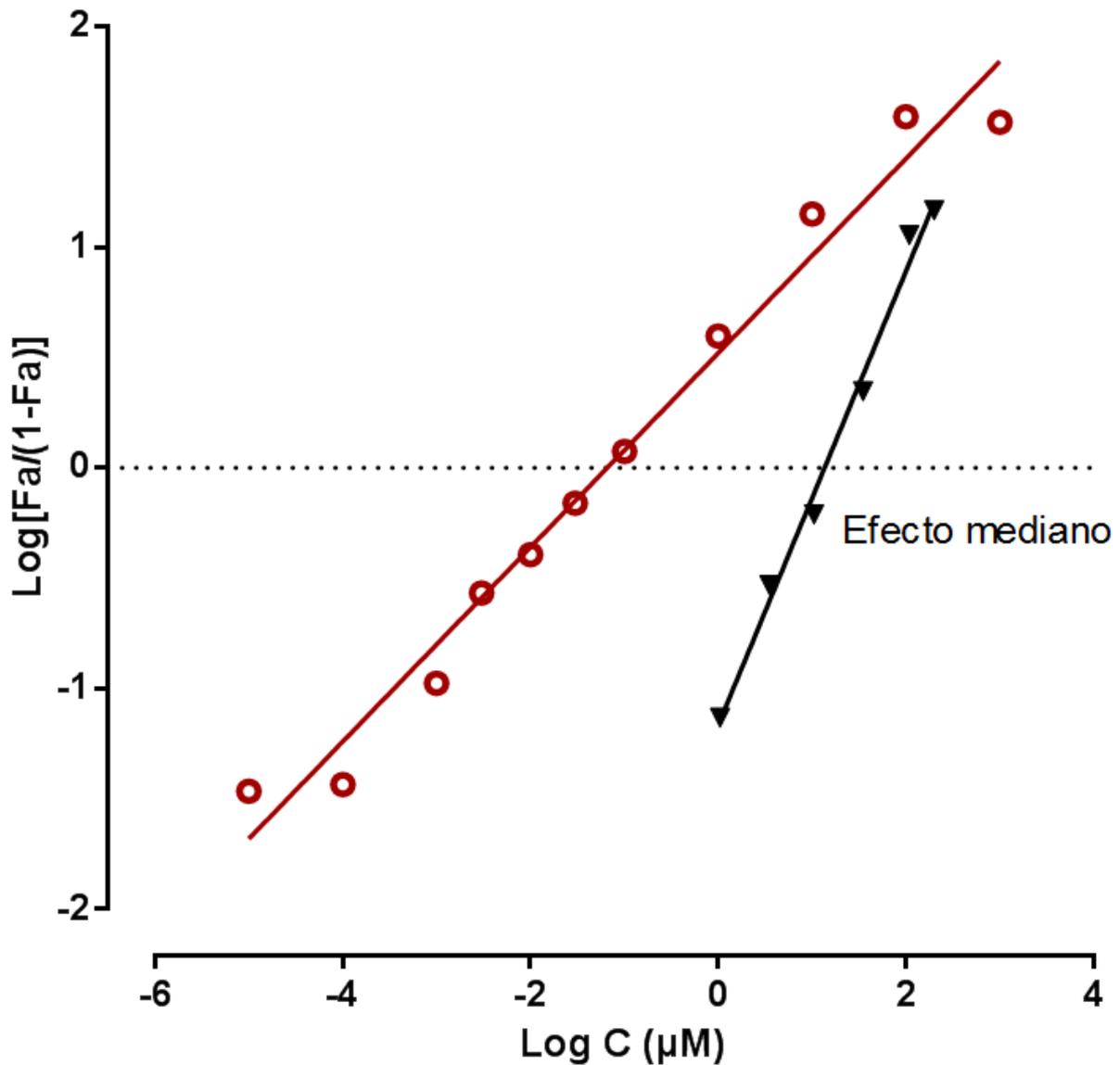


Figura 16. Efecto mediano para el efecto de contracción ocasionado por Cap (en rojo) y la Pip (negro).

Compuesto	D_m (μM)	m	r
Capsaicina	0.06284	0.44183	0.92370
Piperina	13.01419	1.02499	0.92931

Cuadro 4. Relación de los parámetros de la curva de concentración-efecto de capsaicina y piperina por la ecuación del efecto mediano.

En la Figura 17 se aprecia la gráfica del índice de combinación (IC) en función de la fracción afectada (*fa*). En todos los casos el Índice de combinación fue menor a 1 ($IC < 1$) indicando que existe sinergismo.

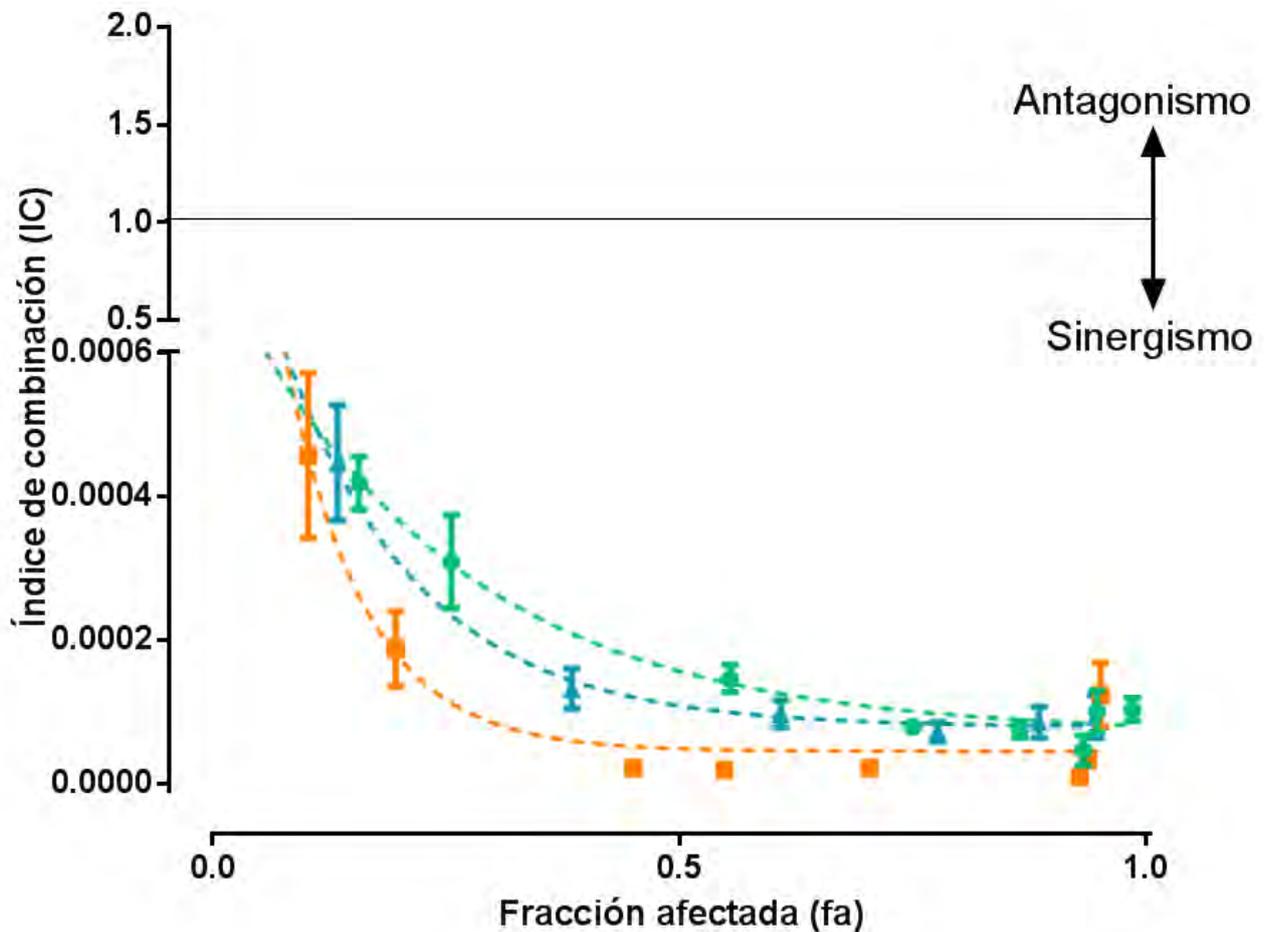


Figura 17. Índice de combinación en función de la fracción afectada (*IC-fa*) para la combinación binaria de Cap y Pip en las relaciones 1:1 (verde), 3:1 (anaranjado) y 1:3 (azul) en tráquea de cobayo. Las líneas punteadas son los datos simulados por computadora para cada combinación.

Combinación	IC			IRD EC_{50}	
	EC_{10}	EC_{50}	EC_{90}	Cap	Pip
Cap-Pip 1:1	0.000516424	0.0000779175	0.0000556459	24132.15	27413.06
Cap-Pip 3:1	0.000208282	0.0000316303	0.0000174364	40892.37	139355.79
Cap-Pip 1:3	0.0000705844	0.0000218194	0.0000268929	166867.50	63184.71

Cuadro 5. Parámetros de Índice de Combinación (IC) y de Índice de reducción de dosis de la gráfica de IC en función de la fracción afectada (*fa*).

En la Figura 18 se puede observar el isoblograma normalizado para las combinaciones de Cap y Pip. Esta gráfica sirve para poder distinguir de manera visual el tipo de interacción que existe entre ambos fármacos; la línea recta representa las concentraciones teóricas, y los puntos muy cercanos al origen son los valores experimentales. Se puede observar que en las combinaciones en las 3 proporciones fijas existe un efecto de sinergia.

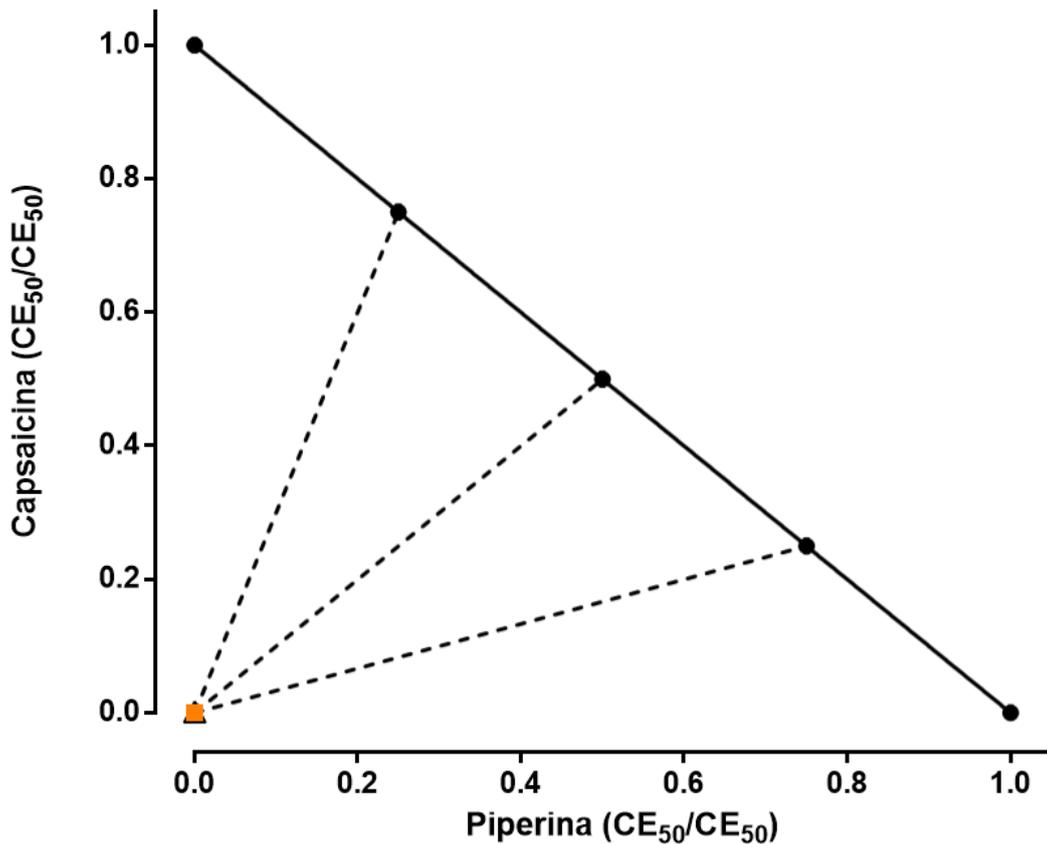


Figura 18. Isoblograma normalizado de la CE₅₀ para la combinación binaria de Cap y Pip en la en las relaciones 1:1 (verde), 3:1 (anaranjado) y 1:3 (azul) en tráquea de cobayo. Las diferencias entre los valores teóricos y los valores experimentales fueron determinados por una prueba *t de Student* con ligeras modificaciones para un análisis isoblográfico, de acuerdo al modelo descrito por Tallarida.

9. DISCUSIÓN

Se observa que la capsaicina es más potente que la piperina debido a que presenta un efecto a concentraciones más bajas ($1 \times 10^{-5} \mu\text{M}$). Sumado a esto, el efecto máximo de contracción que presenta la capsaicina es aproximadamente el doble que el que presenta la piperina; aunque cabe mencionar que la piperina tiene un efecto más rápido para contraer el músculo liso; sin embargo, así como llega más rápido al efecto, también llega más rápido a la taquifilaxia y, por tanto, a la desensibilización del tejido. Se ha reportado que altas concentraciones de capsaicina y piperina conllevan a una inactivación de fibras nerviosas por el tiempo que puede llegar a durar un experimento *in vitro*.^[44] Debido a la desensibilización que presentaba el tejido al realizar las curvas de Pip y Cap, solamente se pudo realizar una curva por tráquea, pues pese a que se dejara estabilizar el tejido durante 2 horas con lavados cada 15 minutos, al comprobar la viabilidad de éste con ACh, no hubo respuesta. Debido a que la Cap presentó efecto a concentraciones, además que la fuerza promedio de contracción máxima de la Cap fue más del doble de la de la Pip, se prefirió la primera para usarla en la interacción con los monoterpenos en los siguientes experimentos.

El linalool, el primero de los monoterpenos que se utilizó para dilucidar la interacción que presentaban en el tejido traqueal de cobayo al administrarse conjuntamente con la capsaicina, mostró un efecto de atenuación significativa de la contracción de una manera que pareciere ser proporcional a la concentración; es decir que a mayor concentración de linalool existe un mayor efecto de atenuación de la contracción ocasionada por Cap. Esto es cierto al menos en las primeras 3 concentraciones (10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este monoterpeno actúa en los canales TRPM8 y de manera no selectiva a los canales TRPA1.^[36] Estudios han sugerido que la activación de los canales TRPM8 por linalool no es tan potente como el de otros monoterpenos como el mentol o la sustancia sintética icilina. El hecho de que a la última concentración la atenuación no fuera la máxima ni tuviera una relación concentración-respuesta puede explicarse a su unión alostérica, o bien en otro receptor. El efecto analgésico de los monoterpenos, de acuerdo a la literatura consultada, puede tener un efecto de despolarización de la membrana, disminuyendo considerablemente el umbral de sensación de estímulos *in vitro*^[45], en este caso, el estímulo químico de la capsaicina. Quizás debido la despolarización que se dio únicamente a la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es que la contracción no se ve inhibida como en las otras concentraciones menores. Asociado a esto, la capsaicina es un ligando

muy afín al canal TRPV1, el cual se sabe que se expresa en mayor cantidad en vías aéreas sanas que los TRPM8, además de que ambos no se co-expresan; esto quiere decir que en el tejido existe una mayor presencia de los canales TRPV1, y que el linalool no es tan afín al TRPM8. ^[13, 14]

El timol fue el otro monoterpeno con el que se estudió la interacción al ser administrado de manera concomitante con capsaicina. Al igual que el linalool, el timol presenta un efecto de atenuación de la contracción. Como se puntualizó anteriormente, el timol es una molécula inespecífica para los canales TRPM8, TRPV3 y TRPA1 ^[30]; esta promiscuidad de la molécula es quizás la razón por la cual la contracción se inhibió casi en su totalidad. Es posible que el timol se haya unido a los receptores TRPV1 e impedido que la Cap ejerciera su efecto sobre éstos. Además, su unión hacia los receptores TRPM8 ocasionó una relajación en el tejido. ^[30] Pese a que se ha referido que el timol actúa sobre los canales TRPA1, los cuales al ser activados producen contracción del MLB, esta unión no es significativa, ya que la incubación con el monoterpeno antes de añadir las concentraciones acumulativas de Cap, produjo una disminución de la línea basal del tejido (Figura 11). En la última concentración de la solución de timol (300 µg/mL) se puede apreciar el mismo fenómeno ocurrido con el linalool, hay un aumento de la contracción el cual no estuvo asociado a una concentración-respuesta. La despolarización de la membrana y la disminución del umbral de sensibilidad ocasionada por la relajación debida a la activación de los canales TRPM8, puede asociarse tanto a linalool como a timol.

El mentol es el más estudiado de los 3 monoterpenos utilizados en este trabajo. Está descrito en varios estudios que se une al canal TRPM8 ^[26, 27, 28] y que produce efecto de relajación en vías aéreas. ^[1] El efecto de atenuación no es similar al de los monoterpenos anteriores. Es importante denotar que pese a que la contracción aún existe, no llega más allá del 50 % al compararla con el grupo control. En este caso, la despolarización de la membrana pareciera ocurrir a concentraciones menores que con los otros monoterpenos, lo cual explicaría el aumento de la contracción ocasionada por capsaicina. Nuevamente, la concentración mayor del monoterpeno se presenta a las concentraciones menores, donde no sólo no hay contracción, sino que hay una relajación significativa y mayor a la que presentan el linalool y el timol. Esto se puede visualizar mejor en la Figura 12, en donde el efecto relajante del mentol es mucho mayor al del linalool. Incluso podría afirmarse que a la concentración de 300 µg/mL de mentol el tejido sufre una

desensibilización, pues ya se ha reportado que el mentol tiene esta característica. Se comprobó que el mentol sí posee un efecto de desensibilización a las concentraciones más altas, y pese a no ser tan potente como el de la Cap, sí afecta al tejido de una manera significativa. Para el asma y síntomas como la tos (EPOC), este resultado demuestra que se puede lograr una relajación traqueal con mentol, y con esto aliviar o reducir los eventos de ataques asmáticos utilizando mentol.

El estudio para comprobar la interacción que existe entre la Cap y la Pip arrojó resultados interesantes. Los efectos de contracción de las combinaciones se presentan a concentraciones menores que las concentraciones para provocar los efectos presentados por los compuestos administrados por separado. Del mismo modo, el efecto de taquifilaxia se presenta mucho antes que la que se observa en los fármacos individuales. Al comparar las concentraciones efectivas cincuenta de estas combinaciones con las de la Cap y Pip administrados individualmente, se puede comprobar que definitivamente presentan el efecto de contracción a concentraciones menores, lo cual es evidencia de sinergismo. Con estos valores se puede sugerir que la combinación Cap-Pip 1:1 es la que presenta el menor efecto aditivo, seguida por la combinación Cap-Pip 3:1, y ésta última por la combinación Cap-Pip 1:3.

Dado que se sabe que tanto la Cap y la Pip actúan en los canales TRPV1 [1, 7, 15- 17, 22-24], una posible explicación al efecto de sinergia encontrado es que pese a ser selectivos para este receptor, tanto la molécula de Cap como la Pip pueden desplazar reversiblemente la una a la otra en la misma diana molecular, haciendo que la conformación y, por ende, la señalización posterior que lleva a la contracción, se vea modificada. La Cap presenta su efecto a concentraciones menores que la Pip, y ésta última tiene la característica de presentar un efecto mayor al aumentar su concentración, lo cual está ligado a la llegada temprana del efecto de taquifilaxia. Este efecto de taquifilaxia que se encontró es útil e importante para estudiarse en otros experimentos, pues en casos donde el dolor persevera es necesario eliminarlo y de manera rápida, como el dolor por *Herpes zóster*.

Otro parámetro que resulta del análisis de la interacción utilizando el IC es el índice de reducción de la dosis (IRD). Este valor es matemáticamente el inverso del IC y representa el número de veces que la dosis o concentración de un fármaco puede reducirse sin afectar el efecto terapéutico. Todas las combinaciones presentaron un IRD mucho mayor

a 1 para cada fármaco, lo cual confirma el efecto de sinergismo que se presentó. Asimismo, es importante pues ayuda a darnos un panorama más amplio acerca de los canales TRPV1 en cuanto a su activación.

10. CONCLUSIÓN

Los monoterpenos timol, linalool y mentol producen un efecto de atenuación de la contracción ocasionada por capsaicina en el músculo liso de las vías aéreas distinto al efecto antagonista clásico, lo que sugiere que dichos mecanismos ocurren en distintas dianas moleculares.

La capsaicina y la piperina presentan una respuesta de sinergia al combinarse en las proporciones 1:1, 3:1 y 1:3, lo que sugiere que se pueden utilizar menores concentraciones para realizar estudios de desensibilización.

11. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto de las combinaciones de monoterpenos mentol, timol y linalool con piperina.
- Realizar estudios de afinidad de los monoterpenos sobre los receptores TRP.
- Evaluar el efecto de la combinación de capsaicina y piperina en un modelo de asma.
- Evaluar y cuantificar el efecto de la combinación de productos naturales que contengan monoterpenos y medicamentos usados para el tratamiento de los síntomas de asma y el EPOC.

12. REFERENCIAS

- [1] M. S. Grace, M. Baxter, E. Dubuis, M. A. Birrel, M. G. Belvisi. *Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: a role in airway disease*. British Journal of Pharmacology. 2014, 171: 2593 – 2607.
- [2] K. H. Banner, F. Igney, C. Poll. *TRP channels: Emerging targets for respiratory disease*. Pharmacology & Therapeutics. 2011, 130; 371 – 384.
- [3] S. Thirstrup. *Control of airway smooth muscle tone: II-Pharmacology of relaxation*. Respiratory Medicine. 2000, 94; 519 – 528.
- [4] K. Hambleton, M. Bafadhel, R. Russel. *Chronic obstructive pulmonary disease: management of chronic disease*. Medicine. 2016, in press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.02.019>).
- [5] J. L. Black, R. A. Panettieri Jr., A. Banerjee, P. Berger. *Airway Smooth Muscle in Asthma. Just a Target for Bronchodilation?* Clinical Chest Medicine. 2012, 33: 543 – 558.
- [6] B. Lan, B. A. Norris, J. C.-Y. Liu, P. D. Paré, C. Y. Seow, L. Deng. *Development and maintenance of force and stiffness in airway smooth muscle*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2015, 93: 1 – 7.
- [7] P. J. Barnes. *The problem of cough and development of novel antitussives*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2007, 20; 416 – 422.
- [8] M. S. Grace, E. Dubuis, M. A. Birrel, M. G. Belvisi. *Pre-clinical studies in cough reserch: Role of Transient Receptor Potential (TRP) channels*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2013, 26: 498 – 507.
- [9] N. Bernd. *TRP Channels in disease*. Biochimica et Biophysica Acta. 2007, 1772: 805 – 812.

- [10] L. P. McGarvey, et al. *Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014, 133: Number 3.
- [11] S. Benemei, R. Paracchini, M. Trevisani, P. Geppetti. *TRP channels*. Current Opinion in Pharmacology. 2015, 22: 18 – 23.
- [12] S. Li, J. Westwick, C. Poll. *Transient receptor potential (TRP) channels as potential drug targets in respiratory disease*. Cell Calcium. 2003, 33: 551 – 558.
- [13] F. J. Taberner, A. López-Córdoba, G. Fernández-Ballester, Y. Korchev, A. Ferrer-Montiel. *The Region Adjacent to the C-end of the Inner Gate in Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Channels Plays a Central Role in Allosteric Channel Activation*. Journal of Biological Chemistry. 2014, 41: Number 41.
- [14] E. A. Laude, A. H. Morice, T. J. Grattan. *The Antitusive Effects of Menthol, Camphor and Cineole in Conscious Guinea-pigs*. Pulmonary Pharmacology. 1994, 7: 179 – 184.
- [15] S. K. Sharma, A. S. Vij, M. Sharma. *Mechanisms and clinical uses of capsaicin*. European Journal of Pharmacology. 2013, 720: 55 – 72.
- [16] M. Hayman, P. C.A. Kam, *Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications*. Current Anaesthesia & Critical Care. 2008, 19: 338 – 343.
- [17] B. S, Szolcsányi J. *Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications*. Trends in Pharmacological Sciences. 1990, 11: 330–333.
- [18] K. Alawi, J. Keeble. *The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation*. Pharmacology & Therapeutics. 2010, 125: 181 – 195.
- [19] S. W. Hwang, U. Oh. *Hot channels in airways: pharmacology of the vanilloid receptor*. Current Opinion in Pharmacology. 2002, 2: 235 – 242.

- [20] E. Ternesten-Hasséus, E-L. Johansson, E. Millqvist. *Cough reduction using capsaicin*. Respiratory Medicine. 2015, 109: 27 – 37.
- [21] Y. Okumura, et al. *Activation of TRPV1 and TRPA1 by Black Pepper Components*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2010, 74: 1068 – 1072.
- [22] F. N. McNamara, A. Randall, M. J. Gunthorpe. *Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor*. British Journal of Pharmacology. 2005, 144: 781 – 790.
- [23] M. Meghwal, T. K. Goswami. *Piper nigrum and Piperine: An Update*. Phytotherapy Research. 2013, 27; 1121 – 1130.
- [24] D. Chavarria, T. Silva, D. Magalhães e Silva, F. Remião, F. Borges. *Lessons from black pepper: piperine and derivatives thereof*. Expert Opinion on Therapeutics Patents. 2015, 26 (Vol. 2); 245 – 264.
- [25] J.-M. Dessirier, N. Nguyen, J.-M. Siefferman, E. Carstens, M. O'Mahony. *Oral Irritant Properties of Piperine and Nicotine: Psychophysical Evidence for Asymmetrical Desensitization Effects*. 1999, 24; 405 – 413.
- [26] A. Amato, R. Liota, F. Mulè. *Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: Analysis of the mechanism of action*. European Journal of Pharmacology. 2014, 740; 295 – 301.
- [27] K. Hui, Y. Guo, Z.-P. Feng. *Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005, 333; 374 – 382.
- [28] V. B. Journigan, N. T. Zaveri. *TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology*. Life Sciences. 2013, 92; 425 – 437.

- [29] B. Liu, L. Fan, S. Balakrishna, A. Sui, J. B. Morris, S.-E. Jordt. *TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain*. Pain. 2013, 154; 2169 – 2177.
- [30] G. Ortar, L. Morera, A. S. Moriello, E. Morera, M. Nalli, V. Di Marzo, L. De Petrocellis. *Modulation of thermo-transient receptor potential (thermo-TRP) channels by thymol based compounds*. 2012, 22; 3535 – 3539.
- [31] H. Xu, M. Delling, J. C. Jun, D. E. Clapham. *Oregano, thyme and clove-derived flavours and skin sensitizers activate specific TRP channels*. Nature Neuroscience. 2006, 9 (No. 5); 628 – 635.
- [32] S. Gavliakova, Z. Biringero, T. Buday, M. Brozmanova, V. Calkovsky, I. Poliacek, K. Plekova. *Antitussive effects of nasal thymol challenges in healthy volunteers*. Respiratory Physiology & Neurobiology. 2013, 187; 104 – 107.
- [33] A. M. Beer, J. Lukanov, P. Sagorchev. *Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of smooth muscles*. Phytomedicine. 2007, 14; 65 – 69.
- [34] C. S. Letizia, J. Cocchiara, J. Lalco, A. M. Api. *Fragrance material review of linalool*. Food and Chemical Toxicology. 2003, 41; 943 – 964.
- [35] L. Berliocchi, R. Russo, A. Levato, V. Fratto, G. Bagetta, S. Sakurada, T. Sakurada, N. B. Mercuri, M. T. Corasaniti. *(-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in C57/BL6 mice*. International Review of Neurobiology. 2009, 0074-7742; 221 – 235.
- [36] P. Batista, E. Harris, M. Werner, A. Santos. *Inhibition of TRPA1 and NMDA channels contributes to anti-nociception induced by (-)-linalool*. Journal of Pain. 2009, 218; 30.
- [37] S. S. Nascimento, et al. *Linalool and linalool complexed in b-ciclodextrin produce anti-hyperalgesic activity and increases Fos protein expression in animal model for fibromyalgia*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology. 2014, 387; 935 – 942.

- [38] H. J. Behrendt, T. Germann, C. Gillen, H. Hatt, R. Jostock. *Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay*. British Journal of Pharmacology. 2004, 141; 737 – 745.
- [39] T. Kenakin. *What is pharmacological ‘affinity’? Relevance to biased agonism and antagonism*. Trends in Pharmacological Sciences. 2014, 35 (No. 9); 434 – 441.
- [40] T.-C. Chou. *Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies*. Pharmacological Reviews. 2006, 58; 621 – 681.
- [41] T.-C. Chou. *Drug Combination Studies and their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method*. Cancer Research. 2010, 70 (2); 440 – 446.
- [42] F. Rodríguez-Ramos, M. Á. Andrade-Moreno, A. Alfaro-Romero, J. L. Balderas-López, A. Navarrete. *Gnaphaliin A and gnaphaliin B synergize the relaxant effect of salbutamol but not of ipratropium in guinea pig trachea*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2016, 68; 533 – 541.
- [43] Daniel Ursu, Kelly Knopp, Ruth E. Beattie, Bin Liu, Emanuele Sher. *Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity*. European Journal of Pharmacology. 2010, 641; 114 – 122.
- [44] T. Bencsik, Z. Sandor, L. Bartho. *High-Concentration Piperine: Capsaicin-Sensitive and –Insensitive Effects on Isolated Organs*. Pharmacology. 2015, 96; 86 – 89.
- [45] B. G. Green, B. L. McAuliffe. *Menthol desensitization of capsaicin irritation: Evidence of a short-term anti-nociceptive effect*. Physiology and Behavior. 2000, 68; 631 – 639.